



วิทยานิพนธ์

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคนของเอนไซม์เบต้า-
กลูโคซิเดสจากพะยูน

**SITE-DIRECTED MUTAGENESIS IN THE AGLYCON
BINDING POCKET OF THAI ROSEWOOD BETA-
GLUCOSIDASE**

นางสาวอมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี

ชีวเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก
พะยูง

Site-directed Mutagenesis in the Aglycone Binding Pocket of Thai Rosewood Beta-
Gluosidase

นามผู้วิจัย นางสาวอมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนโก, ประ.ด.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนโก, ประ.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง

Site-directed Mutagenesis in the Aglycone Binding Pocket of Thai Rosewood Beta-Gluosidase

โดย

นางสาวอมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2550

อมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม 2550: การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D. 124 หน้า

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสไม่เพียงแต่สลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิกเท่านั้น แต่บางชนิดยังสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่นการสลายและปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับลินามารสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง เอนไซม์คัลโคซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนทำหน้าที่ดีกว่าในปฏิกิริยาอื่นการสลาย แต่คือน้อยกว่าในปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส เอนไซม์ทั้งสองชนิดต่างมีความจำเพาะกับสับสเตรทธรรมชาติของตัวเอง (คัลโคซินินกลูโคไซด์และลินามาริน ตามลำดับ) ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงมีความแตกต่างทั้งในการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะต่อสับสเตรท แม้ว่าจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันถึง 70% งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสโดยใช้เอนไซม์คัลโคซิเนสและลินามารสเป็นตัวอย่างศึกษา โดยการแทนที่กรดอะมิโนในช่องจับอะไกลโคโคนของคัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนของลินามารส (M195V H253F N323Q และ K402Y) ทำการแสดงออกคัลโคซินินสกลายพันธุ์ในยีสต์ *Pichia pastoris* และทำให้บริสุทธิ์ คัลโคซินินสกลายพันธุ์ทุกชนิดมีลักษณะคล้ายกับคัลโคซิเนสก่อนกลายพันธุ์โดยการวิเคราะห์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลลาไมด์เจล เวสเทอร์นบลอตติง และอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบบนอนดีแนชเซอริงพอลิอะคริลลาไมด์เจล เมื่อศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส พบว่าค่า K_m ของ M195V N323Q และ K402Y ต่อกัลโคซินินกลูโคไซด์ลดลง แต่ไม่เปลี่ยนแปลงสำหรับ K_m ของ H253F และเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีค่า K_m ต่อกา *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside ลดลง แต่เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดยังคงไม่สามารถสลายลินามารินได้ จากการศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิด พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์เหล่านี้สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิบางตัวเป็นตัวรับน้ำตาลได้ดีกว่าคัลโคซินินธรรมชาติและรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส โดย M195V สามารถใช้ *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี H253F และ N323Q สามารถใช้ methanol *n*-butanol *iso*-butanol และ *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี และ K402Y สามารถใช้แอลกอฮอล์ *n*-butanol *iso*-butanol และ *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี แต่เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกตัวยังคงไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้สรุปได้ว่าตำแหน่งที่เลือกมาทำการกลายพันธุ์ในการทดลองนี้มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส เพราะทำให้คุณสมบัติของเอนไซม์เปลี่ยนไป อาจเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้ได้เอนไซม์กลายพันธุ์ที่สามารถสลายลินามาริน และใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้ ดังนั้นถ้าทำการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่งอาจทำให้เอนไซม์คัลโคซินินสกลายพันธุ์ที่ได้สามารถสลายลินามาริน และสามารถย้ายหมู่ น้ำตาลไปให้ทั้งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิได้

Amornrat Onpium 2007: Site-directed Mutagenesis in the Aglycone Binding Pocket of Thai Roeswood Beta-Glucosidase. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Mrs. Prachumporn Kongsaree, Ph.D. 124 pages.

β -Glucosidases not only hydrolyze of β -glucosidic linkage, but some also catalyze reverse hydrolysis and transglucosylation. Dalcochinase (Thai rosewood β -glucosidase) was better for reverse hydrolysis, but poorer for transglucosylation, when compared with linamarase (cassava β -glucosidase). Both enzymes also exhibit specificities for their natural substrates (dalcochinin glucoside and linamarin, respectively). So they show differences in catalytic properties and substrate preferences, despite sharing 70% amino acid sequence identity. This research aims to identify key amino acid residues for function of β -glucosidases, using dalcochinase and linamarase as models. Amino acid residues in the aglycone binding pocket of dalcochinase were replaced with the corresponding residues of linamarase (M195V, H253F, N323Q and K402Y). Mutant enzymes were expressed in *Pichia pastoris* and purified. All mutants appeared similar to wild-type recombinant dalcochinase as judged by SDS-PAGE, western blot and activity staining on non-denaturing PAGE. Kinetic studies of all mutants, compared with recombinant wild-type dalcochinase, showed a decrease in K_m of M195V, N323Q and K402Y for hydrolysis of dalcochinin glucoside but the same K_m of H253F. K_m of all mutants decreased for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside. No mutant could hydrolyze linamarin. From transglucosylation reaction studies, all mutants could use some primary and secondary alcohols as glucosyl acceptors better than wild-type natural and recombinant dalcochinase. M195V could transfer glucose to *iso*-propanol. H253F and N323Q could transfer glucose to methanol, *n*-butanol, *iso*-butanol and *iso*-propanol. K402Y could transfer glucose to *n*-butanol, *iso*-butanol and *iso*-propanol. Still, none of them could use tertiary alcohol as glucosyl acceptor. So, all mutations selected in this project are important for catalyzing substrate hydrolysis and transglucosylation since they could alter enzyme properties. It is possible that mutation at only 1 position is not enough to generate dalcochinase mutant that can hydrolyze linamarin and use tertiary alcohols as glucosyl acceptor. So, if mutations are made at more than 1 position, the resulting dalcochinase mutant may be able to hydrolyze linamarin and transfer glucose to primary, secondary and tertiary alcohols.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ประชุมพร คงเสรี ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการทำงานวิจัยของวิทยาพนธ์ฉบับนี้ และช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขวิทยาพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุนันทา รัตนโก กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร.เลิศลักษณ์ เงินศิริ กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และรศ.ดร.อาทิตย์สรา ชูเทศะอาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.ม.ร.ว.ชัยยุทธ สวัสดิวัตน์ และ รศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต คาร์นส์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการของอาจารย์ทุกท่านที่ช่วยให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณพี่ชัย ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และอาจารย์ปัญญภัทร โสจิกุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.มหิดล ที่เอื้อเพื่อให้ใช้เครื่อง scanning densitometer และขอบพระคุณอาจารย์ชัยวัฒน์ กิตติกุลหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา ม.เกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเพื่อให้ใช้เครื่อง Elisa scanning ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ และพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณคุณเพ็ญพร สุจิตต์นารัตน์ และคุณนุสรา ทองทับทิม ที่คอยให้คำแนะนำ และคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ และเพื่อนๆ พี่ๆ ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณย่า และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

อมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายอักษรย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	38
สรุปและข้อเสนอแนะ	65
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	72
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานและกราฟปริมาณเอนไซม์	73
ภาคผนวก ข ลำดับเบสของยีนดัล โคซิเนสกลายพันธุ์ M195V	82
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของยีนดัล โคซิเนสกลายพันธุ์ H253F	89
ภาคผนวก ง ลำดับเบสของยีนดัล โคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q	96
ภาคผนวก จ ลำดับเบสของยีนดัล โคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y	103
ภาคผนวก ฉ กราฟ Michaelis-Menten	110
ภาคผนวก ช ภาพ TLC	119
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	124

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ	25
2	ไพรเมอร์ และอุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มียีนดัดโคชินสกลายพันธุ์	27
3	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล	36
4	ปริมาณสารที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอนดีแนชเซอริงพอลิอะคริลาไมด์เจล	37
5	โคโลนียีสต์ <i>P. pastoris</i> ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อ pNP-Glc	48
6	โคโลนียีสต์ <i>P. pastoris</i> ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อ pNP-Glc	49
7	โคโลนียีสต์ <i>P. pastoris</i> ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อ pNP-Glc	49
8	โคโลนียีสต์ <i>P. pastoris</i> ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อ pNP-Glc	50
9	ตารางสรุปการทำวิสุทธิเอนไซม์ดัดโคชินสกลายพันธุ์ M195V ต่อ ปริมาตร culture 1 ลิตร	51
10	ตารางสรุปการทำวิสุทธิเอนไซม์ดัดโคชินสกลายพันธุ์ H253F ต่อ ปริมาตร culture 1 ลิตร	51
11	ตารางสรุปการทำวิสุทธิเอนไซม์ดัดโคชินสกลายพันธุ์ N3213Q ต่อ ปริมาตร culture 1 ลิตร	52
12	ตารางสรุปการทำวิสุทธิเอนไซม์ดัดโคชินสกลายพันธุ์ K402Y ต่อ ปริมาตร culture 1 ลิตร	52
13	ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทุกชนิดในการสลาย pNP-Glc	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทุกชนิดในการสลายตัลโคชินินกลูโคไซด์	57
15	ปริมาณ % alkyl glucoside ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ white clover cyanogenic β -glucosidase (1CBG)	6
2	(a) โครงสร้างของ Dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside และ (b) โครงสร้างโรทีโนน	7
3	cyanogenic glucoside (a) ดินามาริน (b) โลต์สตราลิน	9
4	ปฏิกิริยาไฮยาโนจีนซิส	9
5	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบ (a) inversion (b) retention	10
6	การเกิดปฏิกิริยาซ้อนการสลาย และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส	12
7	กลไกการสลายเมทานอลใน <i>P. pastoris</i>	14
8	พลาสมิด pPICZ A,B,C และ pPICZ α A,B,C	15
9	โครงสร้างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนคัลโคซิเนส	17
10	(a) daidzein (b) genistein และ (c) สารประกอบ isoflavonoid	18
11	วัคซีนป้องกันโรคพิษมาเนีย	19
12	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ที่เร่งโดยเอนไซม์ไกลโคซิเดส	20
13	พลาสมิด pPICZ-His8-trunc TRBG	21
14	ตำแหน่ง forward primer และ screening primer	29
15	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างคัลโคซิเนส (TRglu) และดินามาเรส (CVLM)	38
16	โครงสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนส และตำแหน่ง M195 H253 N323 และ K402 ในช่องจับอะไกลโคนที่จะทำการกลายพันธุ์	39
17	โครงสร้างกรดอะมิโนเมไทโอนีน และเวลีน	39
18	โครงสร้างกรดอะมิโนฮิสติดีน และเฟนิลอะลานีน	40
19	โครงสร้างกรดอะมิโนแอสปารากีน และกลูตามีน	41
20	โครงสร้างกรดอะมิโนไลซีน และไทโรซีน	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคโลนี <i>E. coli</i> (DH5 α) ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนคัลโคซิเนส กลายพันธุ์ M195V	42
22	1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคโลนี <i>E. coli</i> (DH5 α) ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนคัลโคซิเนส กลายพันธุ์ H253F	43
23	1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคโลนี <i>E. coli</i> (DH5 α) ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนคัลโคซิเนส กลายพันธุ์ N323Q	43
24	1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคโลนี <i>E. coli</i> (DH5 α) ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนคัลโคซิเนส กลายพันธุ์ K402Y	44
25	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V	45
26	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F	45
27	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q	46
28	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y	46
29	การวิเคราะห์โปรตีนของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Western blot (a) อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์ เจลซึ่งย้อมด้วย Coomassie brilliant blue และ (b) Western blot	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสแบบ นอนดีแนชเซอริงอะครีลาไมด์เจล (a) ย้อมด้วย 4 MU-Glc (b) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue	56
 ภาพผนวกที่		
ก1	กราฟมาตรฐาน <i>pNP</i> ที่ใช้ในการหาปริมาณเอนไซม์ใน culture media และ ในการทำบริสุทธิ์	74
ก2	กราฟมาตรฐาน <i>pNP</i> ที่ใช้สำหรับหาปริมาณเอนไซม์การศึกษาทางด้าน จลนพลศาสตร์และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส	75
ก3	กราฟปริมาณเอนไซม์ดัล โคซิเนสธรรมชาติที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับ กิจกรรมเอนไซม์	76
ก4	กราฟปริมาณเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัล โคซิเนสที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับกิจกรรมเอนไซม์	76
ก5	กราฟปริมาณเอนไซม์ M195V ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับกิจกรรม เอนไซม์	77
ก6	กราฟปริมาณเอนไซม์ H253F ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับกิจกรรม เอนไซม์	77
ก7	กราฟปริมาณเอนไซม์ N323Q ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับกิจกรรม เอนไซม์	78
ก8	กราฟปริมาณเอนไซม์ K402Y ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับกิจกรรม เอนไซม์	78
ก9	กราฟปริมาณเอนไซม์ลินามารินที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ <i>pNP</i> -Glc กับกิจกรรม เอนไซม์	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ก10	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0-25 $\mu\text{g/ml}$	80
ก11	กราฟมาตรฐานกลูโคส	81
ฉ1	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	111
ฉ2	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	111
ฉ3	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	112
ฉ4	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	112
ฉ5	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	113
ฉ6	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	113
ฉ7	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามารินต่อสับสเตรท $p\text{NP-Glc}$ ตามสมการของ Michaelis-Menten	114
ฉ8	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรท คัลโคซิโนนกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten	114
ฉ9	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรท คัลโคซิโนนกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten	115
ฉ10	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรท คัลโคซิโนนกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten	115
ฉ11	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรท คัลโคซิโนนกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten	116

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ฉ12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามาเรสต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten	116
ฉ13 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten	117
ฉ14 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten	117
ฉ15 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten	118
ฉ16 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten	118
ช1 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M methanol เป็นตัวรับน้ำตา	120
ช2 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M ethanol เป็นตัวรับน้ำตา	120
ช3 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>n</i> -propanol เป็นตัวรับน้ำตา	121
ช4 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>n</i> -butanol เป็นตัวรับน้ำตา	121
ช5 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>iso</i> -butanol เป็นตัวรับน้ำตา	122
ช6 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>iso</i> -propanol เป็นตัวรับน้ำตา	122
ช7 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>sec</i> -butanol เป็นตัวรับน้ำตา	123
ช8 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>tert</i> -butanol เป็นตัวรับน้ำตา	123

คำอธิบายอักษรย่อ

AOX	= Alcohol Oxidase
CVLM	= Linamarase
DHAS	= Dihydroxyacetone Synthase
4 MU-Glc	= 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranoside
<i>p</i> NP	= <i>para</i> -Nitrophenol
<i>p</i> NP-Glc	= <i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside
PCR	= Polymerase Chain Reaction
TLC	= Thin-Layer Chromatography
TRglu	= Dalcochinase

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก พะยุง

Site-directed Mutagenesis in the Aglycone Binding Pocket of Thai Rosewood Beta-Glucosidase

คำนำ

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) (E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) พันธะเบต้า-กลูโคซิดิก (β -glucosidic bond) ที่เชื่อมระหว่างกลูโคสกับน้ำตาล หรือระหว่างกลูโคสกับหมู่ที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ รา และแบคทีเรีย เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสแต่ละ subunit มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55-65 kD มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 5-6 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มาจากแหล่งต่างกันจะมีความจำเพาะต่อไกลโคโคน (glycone) คล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันที่ความจำเพาะต่ออะไกลโคโคน (aglycone) (Esen, 1993) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ความหลากหลายของหน้าที่ทางชีวภาพของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่พบในพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการมากมาย เช่น การเจริญเติบโตของพืช การป้องกันโรค และศัตรูพืช โดยการปล่อยอะไกลโคโคนที่เป็นพิษจากสารประกอบกลูโคไซด์ (เช่น hydroxamic acid, coumarins, thiocyanates, terpenes, saponins และ cyanide เป็นต้น) (Cicek and Esen, 1999) กระบวนการไซยาโนจีนิซิส (cyanogenesis) ที่พบในพืชมากกว่า 3,000 ชนิด เป็นกระบวนการสลายสารประกอบไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (cyanogenic glucosides) ให้กลายเป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) ซึ่งถูกเร่งโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กระบวนการนี้เกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์ หรือเนื้อเยื่อพืชได้รับความเสียหายจากการติดเชื้อจากเชื้อจุลินทรีย์ หรือการเข้าทำลายของศัตรูพืชต่างๆ ซึ่งไฮโดรเจนไซยาไนด์จะไปยับยั้งการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ที่บริเวณนั้น และไฮโดรเจนไซยาไนด์ยังมีพิษต่อมนุษย์และสัตว์อีกด้วย ดังนั้นจึงได้มีการพยายามศึกษาเพื่อลดความเป็นพิษจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยานี้ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสยังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนพืชอีกด้วย โดยการเร่งปฏิกิริยาการสลายฮอร์โมนพืชที่อยู่ในรูปของสารประกอบ

กลูโคไซด์ให้อยู่ในรูปฮอร์โมนพืชอิสระ เช่น abscissic acids, ออกซิน (auxin), ไซโตไคนิน (cytokinin) และจิบเบอเรลลิน (gibberellins) เป็นต้น (Opassiri *et al.*, 2003)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลูโคซีรีโบรซิเดส (glucocerebrosidase) ซึ่งมีสับสเตรทธรรมชาติคือ สฟิงโกซิลกลูโคไซด์ (sphingosylglucosides) และกลูโคซิลซีราไมด์ (glucosylceramide) หากร่างกายขาดเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำให้เกิดการสะสมของสารทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค Gaucher ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรม ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีอาการโลหิตจาง เหนื่อยง่าย ฟกช้ำง่าย และมีแนวโน้มที่จะมีเลือดไหลไม่หยุดเมื่อเกิดบาดแผล บางทีอาจมีอาการตับและตับอ่อนโตร่วมด้วย การรักษาโรคนี้ในสมัยก่อนจะใช้เอนไซม์กลูโคซีรีโบรซิเดสที่สกัดได้จากรกของมนุษย์ฉีดให้แก่ผู้ป่วยโดยตรง ซึ่งการรักษาแบบนี้มีราคาค่อนข้างแพง ปัจจุบันได้นำวิธีการรักษาแบบยีนเทอราปี (gene therapy) มาใช้แทนการรักษาแบบดั้งเดิม (Esen, 1993)

ส่วนในสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ด รา และแบคทีเรีย มีเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสซึ่งอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์เซลลูโลสคอมเพล็กซ์ (cellulase complex) ทำหน้าที่เร่งการสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส ซึ่งกลูโคสที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในสิ่งมีชีวิต และเป็นวัตถุดิบในกระบวนการอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ประเภทคาร์โบไฮเดรต อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ซึ่งเอนไซม์เซลลูโลสคอมเพล็กซ์นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เอ็นโด-1,4-กลูแคนเนส (endo-1,4-glucanase), เอ็กโซ-เบต้า-1,4-กลูแคนเนส (exo- β -1,4-glucanase) และเบต้า-กลูโคซิเดส ซึ่งเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสนี้เองที่เป็นเป้าหมายสำหรับการดัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงคุณภาพให้ได้เอนไซม์ที่ดีสำหรับใช้ในการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสปริมาณมากเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Esen, 1993)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การนำมาใช้ในการกำจัดสารพิษ การผลิตเอทานอล เป็นต้น (Mizutani *et al.*, 2002) สำหรับเอนไซม์ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส (cyanogenic β -D-glucosidase) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าลินามาราส (linamarase) ที่พบในมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) โดยการย้ายกลูโคสจาก *para*-nitrophenyl- β -D-glucoside (*p*NP-Glc) ไปยังแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทดตติยภูมิ และตติยภูมิได้ดี และเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) ได้น้อย (Svasti *et al.*, 2003) ในทางตรงกันข้าม

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าคัลโคซิเนส (dalcochinase) ซึ่งมีสมบัติเป็นได้ทั้งเบต้า-กลูโคซิเดส และเบต้า-ฟิวโคซิเดส (β -fucosidase) (Srisomsap *et al.*, 1996) สามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายเพื่อสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ได้ดี (Svasti *et al.*, 1999) แต่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของแอลกอฮอล์ให้ได้อัลคิลกลูโคไซด์ได้น้อย (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000)

แม้ว่าเอนไซม์คัลโคซิเนส และลินามาเรสมีความคล้ายคลึงกันถึง 70% แต่เอนไซม์ทั้งสองตัวนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่างกัน โดยที่คัลโคซิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายคัลโคชินินกลูโคไซด์ (dalcochinin glucoside) ซึ่งเป็นสับสเตรตธรรมชาติของมันได้ดี ในขณะที่เร่งปฏิกิริยาการสลายลินามารินได้น้อย (คิดเป็น 184% และ <2% เมื่อเทียบกับการสลาย *p*NP-Glc) และในทำนองเดียวกันเอนไซม์ลินามาเรสสามารถเร่งการสลายลินามารินซึ่งเป็นสับสเตรตธรรมชาติของมันได้ดี แต่สลายคัลโคชินินกลูโคไซด์ได้น้อย (Svasti *et al.*, 1999) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสมบัติความจำเพาะต่อสับสเตรต และการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส โดยทำการเปลี่ยนลำดับเบสบางตัวที่คาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาดังกล่าวในบริเวณที่จับกับอะไกลโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนส และคาดว่าจะสามารถทราบกรดอะมิโนที่สำคัญที่เป็นตัวกำหนดความจำเพาะต่อสับสเตรต และได้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสไปยังแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และตติยภูมิได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างเอนไซม์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์กับลินามาเรสเพื่อทำนายตำแหน่งที่อาจมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ดัลโคซิเนส
2. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ (K_m , V_{max} และ k_{cat}) ของรีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ดัลโคซิเนสจากพืช และเอนไซม์ลินามาเรส ในการสลายสับสเตรทต่างๆ
3. เปรียบเทียบคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของรีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรสจากพืช และเอนไซม์ลินามาเรสโดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท
4. เปรียบเทียบคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของรีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรสจากพืช และเอนไซม์ลินามาเรสโดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท

การตรวจเอกสาร

1. การจัดกลุ่มเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) พันธะเบต้า-กลูโคซิดิก (β -glucosidic bond) ที่เชื่อมระหว่างกลูโคสกับน้ำตาล หรือระหว่างกลูโคสกับหมู่ที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) เอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 1 (E.C. 3.2.1) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกรดกลูตามิก (glutamic acid, Glu) สองตัวที่ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และ nucleophile กลไกการเร่งปฏิกิริยาเป็นแบบ retention คือไม่มีการเปลี่ยนโครงสร้างของพันธะกลูโคซิดิกที่เชื่อมกับ anomeric carbon และเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีโครงสร้างแบบ $(\alpha/\beta)_8$ ด้วยเหตุนี้เอนไซม์นี้จึงจัดอยู่ใน clan GH-A ซึ่งเอนไซม์ใน clan นี้จะมีโครงสร้างแบบ $(\alpha/\beta)_8$ (www.cazy.org/CAZY/)

2. โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์ลินามาเรสจาก white clover (1CBG) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 1 ตัวแรกที่พบโครงสร้าง 3 มิติ จากโครงสร้างผลึกพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีการม้วนพับแบบ $(\alpha/\beta)_8$ barrel ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์ glycosyl hydrolase ทั่วไป โดยมี Glu183 และ Glu397 เป็นตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์สูงใน family นี้ ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และ nucleophile ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้อยู่บริเวณด้าน C-terminus ของโพรง $(\alpha/\beta)_8$ barrel ซึ่งบริเวณนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนพวกที่มีขั้ว และกรดอะมิโนที่มีหมู่อะโรมาติกเป็นจำนวนมาก และกรดอะมิโนเหล่านี้มักพบได้ทั่วไปภายในบริเวณจดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate recognition site) โดยที่ Glu183 และ Glu397 จะอยู่ตรงบริเวณจับกับน้ำตาล (sugar-binding site) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้อยู่ห่างกัน 5.2 Å (Barrett *et al.*, 1995) โดยโครงสร้าง 3 มิติของ 1CBG แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ white clover cyanogenic β -glucosidase (1CBG)

ที่มา: Barrett *et al.* (1995)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืช

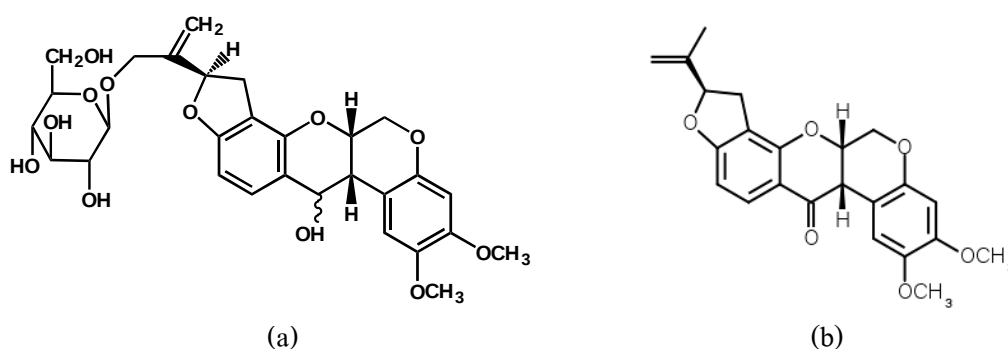
2.1 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดพะยูน

ในปี 1995 Surarit และคณะได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในเมล็ดพืชพื้นเมืองของไทยทั้งหมด 50 ชนิด จาก 17 families พบว่าเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochichinensis* Pierre) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์จากพืชชนิดอื่นๆ โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเร่งการสลายเท่ากับ 5.0 และสามารถเกิดปฏิกิริยาอัตราการสลายได้ เมื่อบ่มเอนไซม์กับน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ความเข้มข้นสูงๆ และเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้น 50%(w/w) D-glucose สามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ (disaccharide) และไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) ได้ (Surarit *et al.*, 1995)

เมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วย isoelectric focusing และ Sephadex G-150 chromatography และทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ที่บริสุทธิ์จะมีค่า K_m ต่อ *para*-nitrophenyl- β -D-glucoside (*p*NP-Glc) เท่ากับ 5.4 mM ค่า k_{cat}/K_m เท่ากับ $57,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ และมีค่า V_{max} เท่ากับ 423 nkat/ml ในสภาพธรรมชาติเอนไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 330,000 Da และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,000 Da ในสภาพเสียสภาพ จึงเชื่อว่าเอนไซม์ชนิดนี้น่าจะประกอบด้วย 4-6

subunits จากการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสพบว่าสารประกอบโปรทสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้นจึงคิดว่ากรดอะมิโนพวกที่เป็นกรดน่าจะมี ความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากสารประกอบโปรทจะไป chelate กับกรดอะมิโนที่เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ยังได้หากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดสในส่วนต่างๆของต้นพะยุง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดสสูงสุดใน เมล็ด จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการสลายสับสเตรทที่อยู่ใน เมล็ดของต้นพะยุง (Srisomsap *et al.*, 1996)

จากนั้น Svasti และคณะจึงได้ศึกษาหาสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์คัลโคชินเนส พบว่าสับสเตรทธรรมชาติของมันได้แก่ 12-dihydroamorphigenin-8'-O- β -D-glucoside (ภาพที่ 2 (a)) เมื่อถูกสลายโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์คือกลูโคส และ 12-dihydroamorphigenin ซึ่งเป็นสารประกอบพวกไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) จึงได้มีการ ตั้งชื่อใหม่ว่าคัลโคชินิน (dalcochinin) ตามชื่อของพืชชนิดนี้คือ *Dalbergia cochichinensis* Pierre และเรียกชื่อสับสเตรทใหม่ว่า dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside จากการศึกษาด้านเภสัชศาสตร์ พบค่า K_m ต่อ dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside เท่ากับ 1.68 mM และค่า V_{max} เท่ากับ 452 nkat/ml ในเมล็ดพะยุงพบสับสเตรทชนิดนี้มากถึง 3.5% ของน้ำหนักเมล็ด และมีเอนไซม์คัลโคชินเนส 0.03% ของน้ำหนักเมล็ด (Svasti *et al.*, 1999) เนื่องจากคัลโคชินินมีโครงสร้างคล้ายกับโรทีโนน (rotenone) (ภาพที่ 2 (b)) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการหายใจ จึงคาดว่าสับสเตรทนี้น่าจะมีบทบาทในการ ป้องกันแมลง และศัตรูพืชอื่นๆ



ภาพที่ 2 (a) โครงสร้างของ Dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside และ (b) โครงสร้างโรทีโนน
ที่มา: Svasti *et al.* (1999)

Cairns และคณะได้หาลำดับเบสของเอนไซม์คัลโคชินเนส และทำการโคลน cDNA ของคัลโคชินเนส พบว่า cDNA ของเอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 547 residues

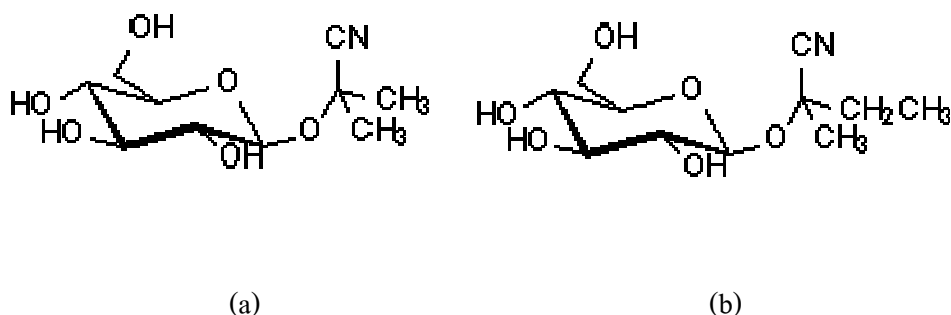
ซึ่งประกอบด้วย propeptide 23 residues ซึ่งเป็น signal peptide ที่จะส่งโปรตีนไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และ mature protein ทั้งหมด 524 residues จากการเปรียบเทียบลำดับอะมิโนพบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคซิเดส (cyanogenic β -glucosidase) จาก white clover และจัดอยู่ใน glycosyl hydrolase family 1 ซึ่งมีความเหมือนกันถึง 60% และมี Glu182 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst และมี Glu396 ทำหน้าที่เป็น nucleophile จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสมีค่า K_m และ V_{max} ต่อ pNP-Glc ใกล้เคียงกับเอนไซม์จากเมล็ดพะยูงที่เคยรายงานไว้ และสามารถสลายสับสเตรทธรรมชาติของมันได้ (Cairns *et al.*, 2000)

2.2 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง

ลินามารเอส (E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่พบในพืชมากกว่า 3,000 ชนิด รวมถึงมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลักของคน และสัตว์ที่อยู่ประเทศเขตร้อนชื้น สับสเตรทของลินามารเอสเป็นสารประกอบพวกไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด ได้แก่ ลินามาริน (2-hydroxyisobutyronitrile- β -D-glucopyranoside) และ โลตัสตราลิน (2-hydroxy-2-methylbutyronitrile- β -D-glucopyranoside) (ภาพที่ 3 (a), (b)) (Ekstittikul and Chulavatnatol, 1988) ลินามารินเป็นสับสเตรทที่พบมากถึง 95% ของสารประกอบไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ทั้งหมด สารประกอบไซยาโนจินิกกลูโคไซด์เป็นสารที่ไม่มีพิษ และร่างกายสามารถขับออกได้ทางปัสสาวะ แต่เมื่อสารพวกนี้ได้รับการกระตุ้นจะแตกตัว และปลดปล่อย HCN ออกมาซึ่งเป็นสารพิษ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่พืชได้รับความเสียหายจากสัตว์กินพืช และแมลงต่างๆ จึงคาดว่ากระบวนการนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองในพืช (Keresztessy *et al.*, 2001) และเรียกกระบวนการเหล่านี้ว่าไซยาโนจีเนซิส (cyanogenesis) ซึ่งมีขั้นตอนการเกิด ดังนี้

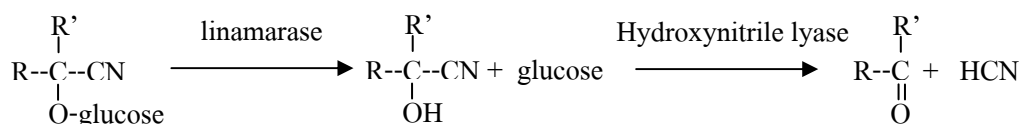
1) ลินามารินจะถูกสลายโดยลินามารเอส ได้เป็นกลูโคส และ hydroxynitrile

2) hydroxynitrile จะถูกสลายต่อโดย hydroxynitrile lyase ได้เป็นคีโตน และ HCN ซึ่งกระบวนการนี้อาจเกิดขึ้นได้เอง (ภาพที่ 4) (Hughes, 1993)



ภาพที่ 3 cyanogenic glucoside (a) ลินามาริน (b) โลตัสตราลิน

ที่มา : Nahrstedt and Mueller (1993)



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาไฮยาโนจินซิส

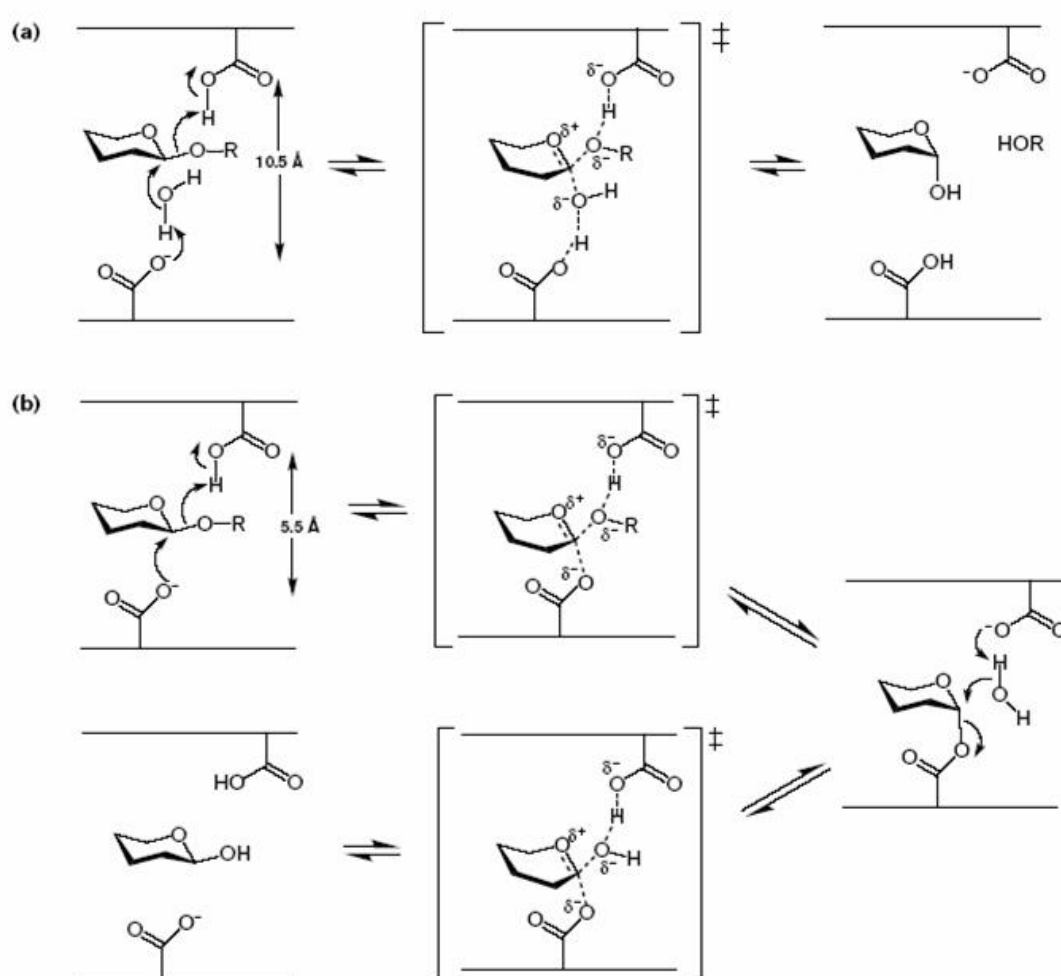
ที่มา: Hughes (1993)

จากการศึกษาการทำวิสุทธ์เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสมี 3 isoform ซึ่งแตกต่างกันที่ค่า pI isoform ที่พบมากที่สุดคือ isoform ที่มีค่า pI เท่ากับ 4.3 และพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสเป็นโอลิโกโพอไซเมอร์ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาด 63 kDa (Ekstittikul and Chulavatnatol, 1988) ต่อมาได้มีการหาลำดับเบสของลินามาเรส พบว่าลำดับเบสนี้สามารถถอดรหัสให้โปรตีนที่มีความยาว 532 อะมิโน และคาดว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 65 kDa ซึ่งโปรตีนนี้คล้ายกับลินามาเรสจาก white clover ถึง 43% (Vetter, 2000) เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังเป็นโกลโคโปรตีนประเภทมีแมนโนสสูง และต่อแบบ N-linked glycan ซึ่งคิดเป็น 7.2% ของน้ำหนักโมเลกุล (Hughes *et al.*, 1992) มี Glu198 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst (Keresztessy *et al.*, 1994) และมี Glu413 เป็น nucleophile ซึ่งกรดกลูตามิกทั้งสองอยู่ใน LNEP และ I/VTENG ซึ่งเป็นลำดับอะมิโนที่มีความอนุรักษ์ใน glycosyl hydrolase family1 ตามลำดับ (Keresztessy *et al.*, 2001)

3. ปฏิกิริยาของเบต้า-กลูโคไซด์

3.1 ปฏิกิริยาการสลาย

ปกติแล้วปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดิกเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ 1) แบบ inversion และ 2) แบบ retention ของ anomeric carbon ของน้ำตาล (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสแบบ (a) inversion และ (b) retention
ที่มา David *et al.* (2000)

สำหรับกลไกแบบ inversion (ภาพที่ 5 (a)) หมู่ carboxylic ทั้ง 2 ตำแหน่งทำหน้าที่เป็น general acid catalyst และ general base catalyst ปฏิกิริยาเกิดผ่านกลไกแบบ single-displacement ซึ่งเกิดผ่าน oxocarbenium ion-like transition state โดยมีขั้นตอนการเกิด คือ หมู่ carboxylic ตัวที่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็น general acid catalyst ให้โปรตอนแก่ ออกซิเจนที่ต่อกับพันธะไกลโคซิดิก พร้อมๆกับการตัดพันธะ ส่วนหมู่ carboxylic อีกหมู่หนึ่งทำหน้าที่เป็น general base catalyst ดึงโปรตอนจากน้ำที่มาโจมตี anomeric carbon เกิดเป็น oxocarbenium ion-like transition state ทั้งสองขั้นนี้เกิดขึ้นพร้อมๆกันได้เป็นน้ำตาลหลุดออกมา

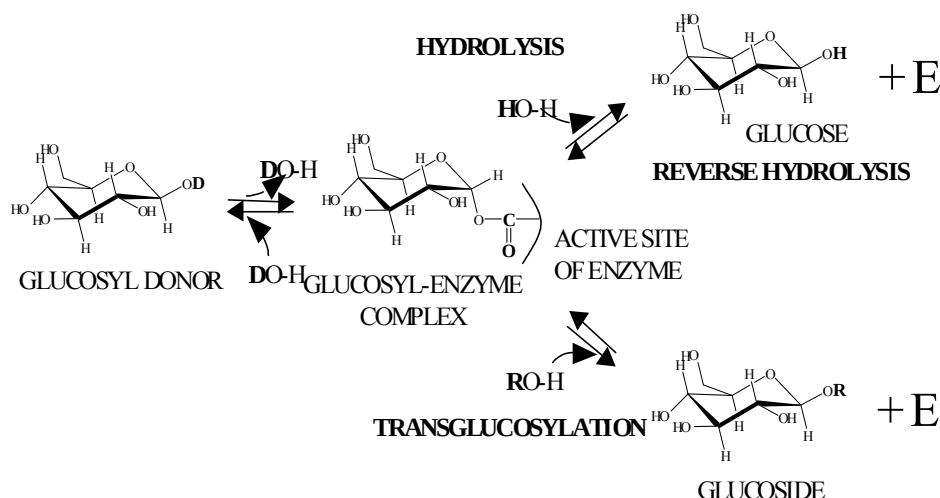
ในทางตรงข้ามกลไกแบบ retention (ภาพที่ 5 (b)) จะเกิดปฏิกิริยาแบบ double displacement ผ่าน glycosyl-enzyme intermediate มีขั้นตอน ดังนี้

1) หมู่ carboxylic ตัวที่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็น general acid catalyst ให้โปรตอนแก่ ออกซิเจนที่ต่อกับพันธะไกลโคซิดิก พร้อมๆกับการตัดพันธะ ส่วนหมู่ carboxylic อีกหมู่หนึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile ซึ่งไปสร้างพันธะโควาเลนต์กับ anomeric carbon ของน้ำตาลเกิดเป็น glycosyl-enzyme intermediate

2) Side-chain carboxylate ทำหน้าที่เป็น general base catalyst โดยดึงโปรตอนจากน้ำที่มาโจมตี anomeric carbon และน้ำตาลจะหลุดออกมาจากพันธะโควาเลนต์กับหมู่ carboxylate ที่เดิมทำหน้าที่เป็น nucleophile (David *et al.*, 2000)

3.2 ปฏิกิริยาการย้อนการสลายและการย้ายหมู่กลูโคส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสบางชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) และการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้ นอกเหนือไปจากปฏิกิริยาเร่งการสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล oligosaccharide และ alkyl glucoside ตามลำดับ (Svasti *et al.*, 2003) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาซ้อนการสลาย และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

ที่มา: Svasti *et al.* (2003)

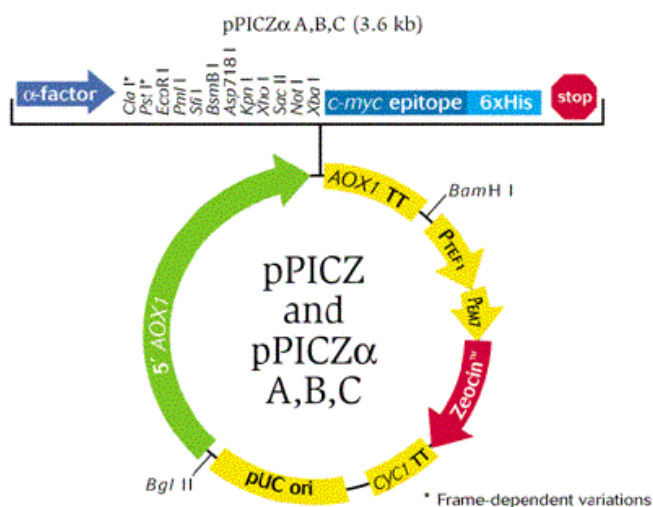
โดยปกติแล้วการทดลองเกี่ยวกับการเร่งปฏิกิริยาการซ้อนการสลายนั้น สามารถทำได้โดยใช้ น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ความเข้มข้นสูง และอุณหภูมิสูงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พวกน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ จากการบ่มเอนไซม์คัลโคซิเนสกับ 50%(w/w) D-glucose ที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นน้ำตาลเจนทิโอไบโอส (gentiobiose) (β -1,6) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในวันแรก และพบน้ำตาล trisaccharide หลังจากผ่านไป 3 วัน (Srisomsap *et al.*, 1999) สำหรับเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังสามารถสังเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลคู่ได้เพียง 5% แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตต่างกันจะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาซ้อนการสลายได้ต่างกัน (Svasti *et al.*, 2003)

ส่วนปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสสามารถทำได้โดยใช้ *p*NP-Glc เป็นตัวให้น้ำตาล (glucosyl donor) และใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่างๆเป็นตัวรับน้ำตาล (glucosyl acceptor) พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสสามารถย้ายน้ำตาลกลูโคสจาก *p*NP-Glc ไปยังแอลกอฮอล์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ อัลคิลกลูโคไซด์ (alkyl glucosides) ซึ่งสามารถเกิดได้ดีกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ สำหรับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเกิดได้ไม่ดี และไม่สามารถเกิดได้เลยกับแอลกอฮอล์ตติยภูมิ เมื่อเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอนต์กับจากเมล็ดพะยูน พบว่าคัลโคซิเนสมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสดีกว่า (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสซึ่งได้จากมันสำปะหลัง (Manihot

esculenta Crantz) พบว่าลินามาเรสสามารถใช้ทั้งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และแอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้ (Svasti *et al.*, 2003)

4. การผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *Pichia pastoris*

การใช้ *P. pastoris* ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีข้อดีคือ มีกระบวนการ post-translational modification เหมือนกับยูคาริโอตชั้นสูง เช่น protein processing, การม้วนพับของโปรตีน การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ การเติมลิปิด และกระบวนการเติมน้ำตาล เป็นต้น *P. pastoris* เป็นยีสต์ที่ใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เรียกว่า methylotrophic yeast กระบวนการใช้เมทานอลเกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลายชนิด เริ่มต้นจาก alcohol oxidase (AOX) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเมทานอลได้เป็นฟอร์มัลดีไฮด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และฟอร์มัลดีไฮด์จะถูกสลายโดยเอนไซม์ catalase ไปเป็นออกซิเจน และน้ำ ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดขึ้นใน peroxisome ฟอร์มัลดีไฮด์บางส่วนจะออกจาก peroxisome และถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ dehydrogenase 2 ตัวที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ได้เป็นฟอร์เมท และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นแหล่งของพลังงานของเซลล์ ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เหลือจะรวมตัวกับ xylulose 5-monophosphate ถูกเร่งโดยเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase (DHAS) ที่อยู่ใน peroxisome ได้ผลิตภัณฑ์เป็น glyceraldehydes 3-phosphate และ dihydroxyacetone ผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ตัวนี้จะออกจาก peroxisome เข้าสู่ pathway ในไซโตพลาสซึมที่สร้าง xylulose 5-monophosphate ทุกๆ 3 รอบของ pathway นี้จะได้ glyceraldehyde 3-phosphate สุทธิ 1 โมเลกุล (ภาพที่ 7) ซึ่งจะพบว่า AOX และ DHAS มีการแสดงออกในระดับสูง ในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในเมทานอล และพบว่า AOX ถูกควบคุมโดยยีน *AOX1* และ *AOX2* ดังนั้นโปรโมเตอร์ *AOX1* และ *AOX2* จึงถูกนำมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของ heterologous protein ที่สนใจ โดยยีน *AOX1* จะถูกควบคุมแบบ repression/depression และแบบเหนี่ยวนำ (induction) นั่นคือถ้ามีกลูโคสจะไม่มีการถอดรหัสของยีน *AXO1* เกิดขึ้น แม้จะมีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล ดังนั้นจึงควรเลี้ยงในกลีเซอรอล และใช้ เมทานอลเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน *AOX1* ซึ่งจะมีการแสดงออกในระดับสูงคิดเป็น $\geq 30\%$ ของโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดของเซลล์ที่เลี้ยงในเมทานอล (Cereghino and Cregg, 2000)

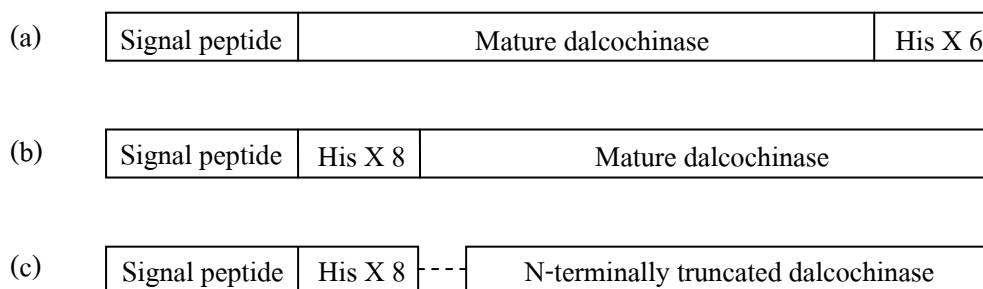


ภาพที่ 8 พลาสมิด pPICZ A,B,C และ pPICZαA,B,C ประกอบด้วย pUC ori เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการจำลองตัว (replication) 5' *AOX1* เป็นโปรโมเตอร์สำหรับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน α -factor เป็นสัญญาณส่งโปรตีนออกสู่เซลล์ multiple cloning site เป็นบริเวณที่จะใส่ยีนของโปรตีนที่ต้องการให้แสดงออก *c-myc* epitope เป็นยีนของโปรตีน *myc* ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จะจับกับ anti *myc* antibody 6xHis คือฉลากฮิสติดีน (polyhistidine tag) ซึ่งประกอบด้วยฮิสติดีน 6 ตัวใช้สำหรับจับกับนิกเกิลในคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography เพื่อทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ *AOX1* TT คือจุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีน *AOX1* P_{TEF1} เป็นโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin ใน *P. pastoris* P_{EM7} เป็นโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะใน *E. coli* zeocin คือยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin, (k) *CYC1* TT คือจุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin

ที่มา: Invitrogen (n.d.)

5. การผลิตรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนคัลโคซิเนสใน *Escherichia coli* พบว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ผลิตได้อยู่ในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำ จึงได้ทำการแสดงออกร่วมกับ groEL เพื่อช่วยให้มีการม้วนพับของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ถูกต้อง รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้โดยวิธีนี้อยู่ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ และมีขนาดใกล้เคียงกับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ซึ่งสามารถทำบริสุทธิ์ผ่าน Ni^{2+} column ได้ แต่โปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์นี้ไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากการวิเคราะห์โดย MS/MS พบว่าโปรตีนนี้เป็น groEL ที่มีขนาดใกล้เคียงกับรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ดังนั้นจึงเปลี่ยนระบบการแสดงออกของยีนคัลโคซิเนสโดยนำยีสต์ *P. pastoris* มาใช้แทน โดยเริ่มจากการโคลนยีนคัลโคซิเนสเข้าไปในเวกเตอร์ pPIC9K แต่รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากวิธีนี้ไม่มี polyhistidine tag ติดอยู่ที่ปลาย C-terminal จึงไม่สะดวกต่อการทำบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-TRBG-His6 (ภาพที่ 9 a) โดยการโคลนยีนคัลโคซิเนสเข้าไปในเวกเตอร์ และให้ปลาย N-terminal ติดกับ α mating factor ซึ่งพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสใน culture media หลังจากที่เหมาะสมให้มีการแสดงออกด้วย 0.5% เมทานอล เมื่อทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนผ่าน Ni^{2+} column พบว่ารีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งคาดว่ามันจะเกิดจากกระบวนการ processing ในขั้น post-translation modification ทำให้ polyhisidine tag ถูกตัดออกไป จึงได้ลองสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใหม่ pPICZ-His8-TRBG โดยให้ polyhistidine tag ติดอยู่ที่ปลาย N-terminal ของยีนคัลโคซิเนส (ภาพที่ 9 b) แต่รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ยังคงไม่สามารถทำบริสุทธิ์ผ่าน Ni^{2+} column ได้ จากการหาลำดับอะมิโนทางด้านปลาย N-terminal ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธีเดียวกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ พบว่ากรดอะมิโน 12 ตัวแรกของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสขาดหายไป ดังนั้นจึงได้สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใหม่ โดยตัดกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminal ออกไปบางส่วน โดยให้เริ่มต้นที่ VPPFN ตามด้วย α mating factor propeptide และ histidine 8 ตัว ได้เป็น pPIC-His8-truncTRBG (ภาพที่ 9 c) พบว่าโคลนของ *P. pastoris* ที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPIC-His8-truncTRBG แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และสามารถทำบริสุทธิ์ผ่าน Ni^{2+} column ได้ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ได้มีสมบัติทางด้านจลนพลศาสตร์ พิเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเหมือนกับคัลโคซิเนสธรรมชาติ (Toonkool *et al.*, 2006)



ภาพที่ 9 โครงสร้างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนคัดโคชินเนส (a) pPICZ-TRBG-His6

(b) pPICZ-His8-TRBG และ (c) pPICZ-His8-truncTRBG

ที่มา: Toonkool *et al.* (2006)

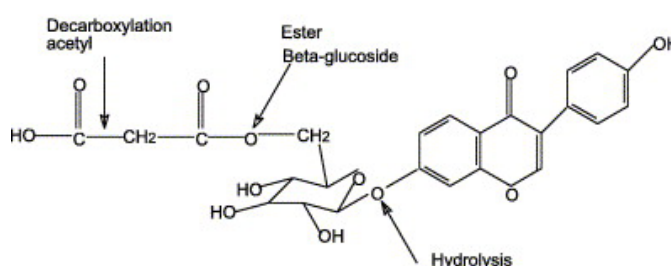
6. ประโยชน์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสามารถเกิดได้ทั้งปฏิกิริยาเร่งการสลาย ปฏิกิริยาข้อนการสลาย และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (Svasti *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงถูกนำไปในการเร่งปฏิกิริยาการสลาย และสังเคราะห์สารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์ และอัลคิลกลูโคไซด์ต่างๆมากมายที่ใช้ในทางอุตสาหกรรมทางอาหาร ยา และเครื่องสำอางค์ เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการสังเคราะห์ทางเอนไซม์คือสามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว ไม่จำเป็นต้องมีหมู่ป้องกัน และผลิตภัณฑ์ที่ได้มี stereospecificity และมี regioselectivity สูง ในขณะที่การสังเคราะห์ทางเคมีมีความยุ่งยากกว่า เนื่องจากน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสับสเตรทมีหมู่ไฮดรอกซิลหลายหมู่ ดังนั้นจึงต้องมีหมู่ที่ทำหน้าที่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลเหล่านี้ และต้องเอาหมู่ป้องกันนี้ออก (Palcic, 1999)

6.1 ประโยชน์ของปฏิกิริยาเร่งการสลาย (hydrolysis)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสถูกนำมาใช้ในการสลายสารประเภทไอโซฟลาโวน ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืช ที่มีโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ของมนุษย์ ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทในการป้องกันโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ป้องกันอาการช่วงหมดประจำเดือน และโรคกระดูกเปราะได้ isoflavone ที่ถูกศึกษามากคือ daidzein และ genistein ซึ่งเป็นสารประกอบพวกกลูโคไซด์ที่พบในถั่วเหลือง เนื่องจากไอโซฟลาโวนที่อยู่ในรูปกลูโคไซด์ถูกดูดซึมในลำไส้เล็กได้ยาก เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลใหญ่ และมีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง ดังนั้นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจึงมีบทบาทช่วยในการสลายสารเหล่านี้ให้อยู่ในรูป daidzein (ภาพที่ 10 (a)) และ

genistein (ภาพที่ 10 (b)) ซึ่งอยู่ในรูปที่สามารถถูกดูดซึมได้ในลำไส้เล็ก ปัจจุบันได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความเหมาะสม มาใช้ในการหมักนมถั่วเหลือง ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณ daidzein และ genistein ในนมถั่วเหลืองให้มากยิ่งขึ้น (Pyo *et al.*, 2005)



(c)

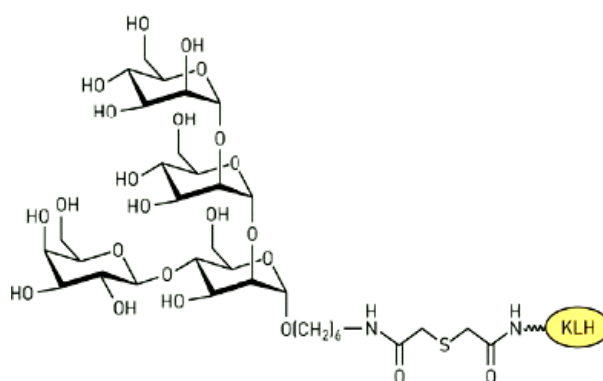
ภาพที่ 10 (a) daidzein (b) genistein และ (c) สารประกอบ isoflavonoid ที่อยู่ในรูปสารประกอบกลูโคไซด์ คือ มีคาร์โบไฮเดรตต่อกับ C-7 ของ isoflavone และมีหมู่ acetyl หรือ malonyl ต่อกับ C-6 ของน้ำตาล

ที่มา: Pyo *et al.* (2005)

6.2 ประโยชน์ของปฏิกิริยาขบวนการสลาย

สารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารประกอบที่มีอยู่มากมาย และมีโครงสร้างซับซ้อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในทางชีววิทยา คือ เป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีน และไกลโคลิพิดของผิวเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงาน เช่น เซลโลไบโอส และแป้ง เนื่องจากการศึกษาทางด้าน glycobiology ก้าวหน้ามากขึ้น และงานวิจัยมักจะเน้นไปที่บทบาทของคาร์โบไฮเดรตในทางชีววิทยา ดังนั้นการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ และการปรับปรุงวิธีสังเคราะห์สารประกอบเหล่านี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์เฉพาะทางมากยิ่งขึ้น (Palcic, 1999) ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาโอลิโกแซคคาไรด์มาใช้เป็นวัคซีน และยารักษาโรคต่างๆมากมาย ตัวอย่างเช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้มาลาเรีย โรคนี้เกิดจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งจะปล่อยสารพิษพวกคาร์โบไฮเดรตออกมา ดังนั้นจึงได้มีการเลียนแบบโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตตัวนี้เพื่อนำไปทำเป็นวัคซีน ซึ่งจากการทดลองฉีดในหนูแล้วพบว่าหนูไม่ตายเมื่อสัมผัสกับเชื้อ

P. falciparum นอกจากนี้การทดลองสังเคราะห์วัคซีนป้องกันโรคโลหิตมาเนีย ซึ่งได้มีการเลียนแบบ โอลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่บนผิวเซลล์เชื้อโลหิตมาเนีย ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งแล้วนำมาเชื่อมกับโปรตีน ตัวพา (keyhole limpet hemocyanin (KLH)) (ภาพที่ 11) จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าให้ผลดี (Hewitt and Seeberger, 2001)

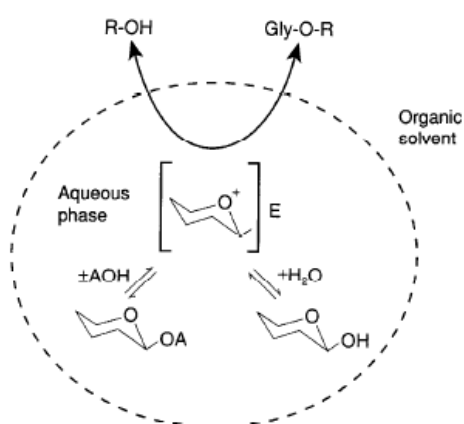


ภาพที่ 11 วัคซีนป้องกันโรคโลหิตมาเนีย

ที่มา: Hewitt and Seeberger (2001)

6.3 ประโยชน์ของปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

สารประเภทอัลคิลกลูโคไซด์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมทางยา และการแพทย์ต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) เป็นต้น ตัวอย่างสารที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น Lauryl diglucoside, Decacyl glucoside และ Coco-glucoside ข้อดีของอัลคิลกลูโคไซด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเอนไซม์ คือ เป็นสารที่สังเคราะห์มาจากธรรมชาติ (น้ำตาล และ fatty alcohol) และสามารถสลายได้เองในธรรมชาติ การสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ทำได้ในระบบ 2 เฟส คือน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ (ภาพที่ 12) โดยที่เอนไซม์ไกลโคซิเดสจะถูกตรึงอยู่ในสารละลายน้ำตาลอิมัลชันในชั้นน้ำ และแอลกอฮอล์ปฏิกิริยาที่มีความยาวสายปานกลางจะอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ น้ำตาลพวกโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นจะอยู่ในชั้นน้ำ ส่วนอัลคิลกลูโคไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาย้ายหมู่น้ำตาลจะถูกดึงไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งสามารถแยกอัลคิลกลูโคไซด์ออกมาได้โดยวิธีทางเคมี โดยวิธีนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 95% (Sarney and Vulfson, 1995)



ภาพที่ 12 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ที่เร่งโดยเอนไซม์ไกลโคซิเดส
ที่มา: Sarney and Vulfson (1995)

อุปกรณ์และวิธีการ

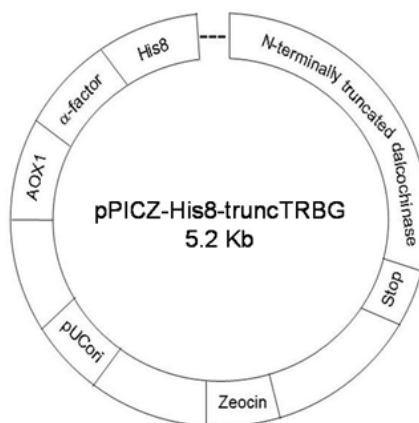
อุปกรณ์

1. เชื้อและพลาสมิด

1.1 *Pischia pastoris* (GH115) genotype *his4*

1.2 *Escherichia coli* (DH5 α) genotype supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15)hsdR17
recA1endA1gyrA96thi-1relA1

1.3 พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นพลาสมิด pPICZ α B ที่มียีน
คัลโคซิเนส (ลำดับกรดอะมิโนเริ่มที่ VPPFN) และนำหน้าด้วยลำดับเบสของฮิสติดีน 8 ตัว เป็น
พลาสมิดที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Toonkool *et al.*, 2006)



ภาพที่ 13 พลาสมิด pPICZ-His8-trunc TRBG ซึ่งประกอบด้วย pUC ori เป็นจุดเริ่มต้น
ของกระบวนการจำลองตัว (replication) *AOX1* เป็นโปรโมเตอร์สำหรับใช้
ในการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน α -factor เป็นสัญญาณส่งโปรตีนออกสู่
นอกเซลล์ His8 เป็นฉลากฮิสติดีน (polyhistidine tag) ซึ่งประกอบด้วยฮิสติดีน 8
ตัวใช้สำหรับจับกับนิกเกิลในคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity N-terminally truncated
dalcocinase เป็นยีนคัลโคซิเนสที่ลำดับกรดอะมิโนเริ่มที่ VPPFN และ zeocin
คือยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin

2. สารเคมีและอุปกรณ์

2.1 เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.2 ลินามาริน (จากนางสาวนุสรรา ทองทับทิม)

2.3 เอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติ (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.4 Acrylamide (Bio Basic, Canada)

2.5 bis-Acrylamide (Bio Basic, Canada)

2.6 Agarose (Research Organics, USA)

2.7 Amicon Ultracentrifugal Filter (Millipore, USA)

2.8 Ammonium sulphate (Ajex Finechem, Australia)

2.9 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Roche, USA)

2.10 *n*-Butanol (Lab-Scan, Thailand)

2.11 *iso*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.12 *sec*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.13 *tert*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.14 Coomassie Plus Protein Assay reagent kit (Pierce, USA)

2.15 Dalcochinin-8'-*O*- β -D-glucoside (ห้องปฏิบัติการของ ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

2.16 DyNAzymeII DNA polymerase (Finnzymes, Finland)

2.17 ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham, Sweden)

2.18 *Eco*RI (Fermentss, USA)

2.19 Ethanol (Carlo ERBA, Italy)

2.20 Ethyl acetate (Carlo ERBA, Italy)

2.21 Glucose Assay Kit (Sigma, USA)

2.22 Imidazole (ICN Biomedical, Germany)

2.23 Methanol (Lab-Scan, Thailand)

2.24 α -D-Methylglucoside (ACROS organics, USA)

2.25 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (4-MU-Glc) (Sigma, USA)

- 2.26 Mouse monoclonal antibody against natural dalcochinase ห้องปฏิบัติการ
รศ.ดร. วัชรระ กสิณฤกษ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- 2.27 Nucleospin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Germany)
- 2.28 Ni-NTA Superflow (Qiagen, Germany)
- 2.29 *para*-Nitrophenol (*p*NP) (Sigma, USA)
- 2.30 *para*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) (Sigma, USA)
- 2.31 PCR-clean-up Gel extraction NucleoSpin® Extract II(Macherey-Nagel, Germany)
- 2.32 *pfu* DNA Polymerase (Promega, USA)
- 2.33 Phenyl-sepharose CL-4B (Amercham, Sweden)
- 2.34 *n*-Propanol (Carlo ERBA. Italy)
- 2.35 *iso*-Propanol (Carlo ERBA. Italy)
- 2.36 Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako Cytomation, Denmark)
- 2.37 *SacI* (Fermentas, USA)
- 2.38 Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium Sheets (Merck, Germany)
- 2.39 Sodium acetate (Merck, Germany)
- 2.40 Sodium carbonate (Ajex Finechem, Australia)
- 2.41 Zeocin (Invitrogen, USA)

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็น analytical grade

วิธีการ

1. การทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

1.1 การหาตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างคัลโคซิเนส และลินามาเรส โดยโปรแกรม Clustal W เพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งแขนงข้างของกรดอะมิโนต้องยื่นเข้าไปในบริเวณจับอะไกลโคโคน (aglycone binding site) โดยพิจารณาบริเวณจับอะไกลโคโคนจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์คัลโคซิเนสเป็นต้นแบบ ในการทดลองนี้ได้เลือกตำแหน่งกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งคือ M194V H253F N323Q และ K402Y ของคัลโคซิเนส เพื่อให้เหมือนกับกรดอะมิโนในลินามาเรส

1.2 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ให้ตำแหน่งที่ต้องการกลายพันธุ์อยู่ตรงกลางสาย โดยไพรเมอร์ทั้งสองที่ออกแบบต้องมีลำดับเบสที่เป็นคู่สม และมีความยาวประมาณ 25-45 เบส และมีค่า melting temperature (T_m) ≥ 78 °C โดยค่า T_m คำนวณมาจาก

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

N = จำนวนเบสของไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ดีควรมีค่า %GC มากกว่า 40% และควรมีเบส G หรือ C อยู่ทางด้านปลายทั้งสองข้างของไพรเมอร์อย่างน้อยสุด 1 ตัว โดยไพรเมอร์ที่ใช้ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

ตำแหน่งกลายพันธุ์	Forward primer	Reverse primer
M195V	5' GGG TAT GCA TAC GGT GTT TTT GCA CCA GGT CGA TGT TCT CC 3'	5' GGA GAA CAT CGA CCT GGT GCA AAA ACA CCG TAT GCA TAC CC 3'
H253F	5' CAG AAA GGT ACA ATA GGC ATT TCC TTG TTT GTA GTT TGG GTT ATA CCG C 3'	5' GCG GTA TAA CCC AAA CTA CAA ACA AGG AAA TGC CTA TTG TAC CTT TCT G 3'
N323Q	5' GGG TTC ATT TGA TTT TAT TGG ACT ACA ATA TTA CAC CAC TAA CTA TGC TAC C 3'	5' GGT AGC ATA GTT AGT GGT GTA ATA TTG TAG TCC AAT AAA ATC AAA TGA ACC C3'
K402Y	5' GGT ATA GAT GAG TAC AAT GAT GCA TCA CTA TCA CTT GAG GAA TCC 3'	5' GGA TTC CTC AAG TGA TAG TGA TGC ATC ATT GTA CTC ATC TAT ACC 3'

หมายเหตุ นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

1.3 การทำปฏิกิริยาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

ทำการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ pPICZ-His8-truncTRBG เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอกลายพันธุ์ และใช้สารต่างๆดังนี้

Double-stranded DNA template (ปริมาณ 5 ng)	2	μl
10x reaction buffer	5	μl
25 ng/μl forward primer	5	μl
25 ng/μl reverse primer	5	μl
2 mM dNTP	1	μl
น้ำกลั่น	31	μl
2.5 U/μl <i>pfu</i> DNA polymerase	1	μl
Total volume	50	μl

ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

95 °C	30 วินาที	1	รอบ
95 °C	30 วินาที	}	16 รอบ
55 °C	1 นาที		
68 °C	12 นาที		
4 °C	∞	1	รอบ

จากนั้นเติมเอนไซม์ *DpnI* (10 U/ μ l) 1 μ l เพื่อทำลายดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. การถ่ายยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* (DH5 α)

2.1 การเตรียม competent *E.coli* (DH5 α)

เลี้ยง *E.coli* (DH5 α) 1 โคโลนีในอาหาร LB (1%(w/v) Bacto Tryptone, 0.5%(w/v) Bacto Yeast Extract, 0.5%(w/v) NaCl) ปริมาตร 3 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดออกมา 2 ml เลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 200 ml ที่ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm จนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5-1.0 นำ flask มาวางแช่น้ำแข็ง 15-30 นาที นำเซลล์ไปเหวี่ยงที่ 4000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งส่วนใส แล้วละลายเซลล์ในน้ำเย็น 200 ml นำไปเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 4000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายเซลล์ในน้ำเย็นอีกครั้ง ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วละลายเซลล์ใน 10% glycerol ที่เย็น 4 ml และนำไปเหวี่ยงที่ 4000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที อีกรอบเพื่อแยกเอาเฉพาะเซลล์ไปละลายใน 10% กลีเซอรอล 0.4 ml แบ่งเก็บไว้ที่ -70 °C ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดละ 40 μ l

2.2 การถ่ายยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli*

ทำการถ่ายพลาสมิดที่มียีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ competent *E.coli* จากข้อ 2.1 โดยวิธี electroporation โดยผสมพลาสมิด 1-10 ng กับ competent *E.coli* 40 μ l ปั่นในน้ำแข็งนาน 0.5-1 นาที ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ cuvette เคาเซเบาๆ ให้เซลล์นอนก้นระวังอย่าให้มีฟอง ปรับเครื่อง Gene pluserTM (Bio-Rad, USA) ที่ 25 μ F, 200 Ω , 2.5 kV แล้วกดปุ่ม pulse เติม LB, pH 7.5 ปริมาตร 1 ml ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm จากนั้นนำมา

เหวี่ยงความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูอาหารออก 800 μ l ที่เหลือนำมา spread บนอาหาร ฐาน LB, pH 7.5 (1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl, 1.5%(w/v) agar) ที่มี zeocin 25 μ g/ml เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มียีนดัดโคจีนในสกลายพันธุ์ บ่มที่ 37 °C ซ้ำมกลืน

3. การคัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่มียีนดัดโคจีนในสกลายพันธุ์โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนดัดโคจีนในสกลายพันธุ์ให้มีความยาวประมาณ 20 เบส และมีตำแหน่งกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 3' มี Tm ประมาณ 60 °C ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ และอุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มียีนดัดโคจีนในสกลายพันธุ์

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์	Annealing temperature (Ta) °C
M195V	5' CATCGACCTGGTGCAAAAAC 3'	55
H253F	5' GCGGTATAACCCAAACTACAAA 3'	45
N323Q	5' GCATAGTTAGTGGTGTAAATTG 3'	39
K402Y	5' GTGATAGTGATGCATCATTGTA 3'	39

หมายเหตุ นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

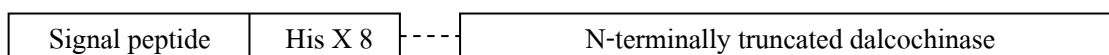
นำโคลนที่ได้จากข้อ 2.2 มาละลายน้ำ 20 μ l และนำไปวิเคราะห์หาฮีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังนี้

โคลน	10	μ l
10 pmol/ μ l forward primer	1	μ l
10 pmol/ μ l screening primer	1	μ l
10x reaction buffer	2.5	μ l
2 mM dNTP	1	μ l
50 mM MgCl ₂	0.75	μ l
2 U/ μ l DyNAzymeII DNA polymerase	0.5	μ l
น้ำกลั่น	8.25	μ l
Total volume	25	μ l

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อคัดเลือกลายฮีนดัลโคซินเนสกลายพันธุ์

95 °C	30	วินาที	1	รอบ
95 °C	60	วินาที	}	20 รอบ
Ta °C	30	วินาที		
72 °C	1	นาที่		
72 °C	8.3	นาที่		
4 °C	∞			

จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้โดย 1% agarose เพื่อตรวจสอบขนาดที่ถูกต้องของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ตำแหน่ง forward primer และ screening primer ซึ่งคาดว่าจะได้ผลิตภัณฑ์

M195V ขนาด 931 bp, H253F 1105 bp, N323Q 1315 bp และ K402Y 1555 bp

4. การสกัดพลาสมิดจาก *E.coli*

4.1 การสกัดพลาสมิดจาก *E.coli* เพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* เบื้องต้น

เลี้ยงโคโลนีที่มียีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ตรวจสอบได้จากข้อ 3 ในอาหาร LB, pH 7.5 ปริมาตร 3 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน ดูดเชื้อมา 1.5 ml นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส เติมน้ำสะอาด 1 (50 mM glucose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 µl แล้วผสมตะกอนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำสะอาด 2 (1% SDS, 0.2 M NaOH) ปริมาตร 200 µl ผสมเบาๆ เติมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำสะอาด 3 (3 M potassium acetate, 2 M acetic acid) ที่เย็น ปริมาตร 150 µl ผสมเบาๆ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสให้หมดใหม่ เติมน้ำ 100% ethanol ปริมาตร 900 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส และล้างตะกอนด้วย 70%(v/v) ethanol 150 µl เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส เปิดฝาทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง ละลายพลาสมิดที่ได้ด้วย TE buffer (10 mM Tris.HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 20 µl แบ่งพลาสมิด ปริมาตร 2 µl ไปตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เพื่อตรวจสอบผลการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ และนำไปตรวจสอบโดยใช้ 1% (w/v) agarose ใน 1x TAE (40 mM Tris, 0.1142%(v/v) glacial acetic acid, 2 mM EDTA, pH 8.5) โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	2	μl
1 μg/μl BSA	1	μl
2 mg/ml RNase	1	μl
10x reaction buffer	1	μl
10 U/μl <i>EcoRI</i>	0.5	μl
น้ำกลั่น	4.5	μl
Total volume	10	μl

4.2 การสกัดพลาสมิดเพื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส

ทำโดยนำโคโลนีที่ตรวจสอบได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในอาหาร LB, pH 7.5 ที่มี zeocin เข้มข้น 25 μg/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดเชื้อมา 5 ml เพื่อทำการสกัดพลาสมิดตามคำแนะนำของชุดสกัดพลาสมิด Nucleospin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Germany) และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ Macrogen ประเทศเกาหลี

5. การถ่ายยีนดัดโคจีนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *P.pastoris*

5.1 การเตรียมพลาสมิดให้อยู่ในรูปเส้นตรงเพื่อเตรียมถ่ายเข้าสู่ *P.pastoris*

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 4.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* บ่มเป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วแบ่งพลาสมิดมา 2 μl เพื่อตรวจสอบการตัดด้วย 1% agarose ใน 1x TAE นำพลาสมิดที่เหลือมาตกตะกอนด้วย 100% ethanol โดยเติม 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารทั้งหมด จากนั้นเติม ethanol 2.5 เท่าของปริมาตรสารทั้งหมด วางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสด้านบน ล้างตะกอนด้วย 70%(v/v) ethanol ปริมาณ 100 μl นำไปเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 10 μl

ภาวะการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *SacI*

ดีเอ็นเอ	10	μl
10 U/μl <i>SacI</i>	1	μl
10x reaction buffer	2	μl
1 mg/ml BSA	2	μl
2 mg/ml RNase	2	μl
น้ำกลั่น	3	μl
Total volume	20	μl

5.2 การเตรียม competent *P. pastoris*

เชื้อเชื้อยีสต์ 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร YPD (1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 2%(w/v) glucose) ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1 คืน ดูดเชื้อมา 1 ml มาเลี้ยงใน YPD ปริมาตร 50 ml อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1 คืน นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเซลล์ออกมา ล้างเซลล์ด้วยน้ำเย็นปริมาตรเท่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย 1 M sorbitol เย็นปริมาตรเท่าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm เทส่วนใสทิ้ง ละลายเซลล์ใน 1 M sorbitol ปริมาตร 1-2 ml เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 80-100

5.3 การถ่ายยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *P. pastoris* โดยวิธี electroporation

เตรียมพลาสมิดที่ได้จากข้อ 5.1 ให้ได้ปริมาณ 5 μg ปริมาตร 10 μl มาบ่มกับ competent ยีสต์ที่เย็น 80 μl ในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ cuvette เคาะเบาๆ ให้เซลล์นอนก้นระวังอย่าให้มีฟอง ปรับเครื่อง Gene pluser™ 25 μF, 200 Ω, 1.5 kV แล้วกดปุ่ม pulse เติม 1 M sorbitol ที่เย็น 1 ml ทันที นำมาเหวี่ยงความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูด sorbitol ออก 800 μl ที่เหลือนำมา spread บนอาหารยูน YPDS, pH 7.5 (1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 2%(w/v) glucose, 1 M sorbitol, 2%(w/v) agar) ที่มี zeocin 100 μg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มียีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์

6. การคัดเลือกโคโลนียีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

นำโคโลนียีสต์ที่ได้จากข้อ 5.3 มาเลี้ยงในอาหาร BMGH (0.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(w/v) ammonium sulfate, 100 mM potassium phosphate, pH6.0, 1%(w/v) glycerol, 4×10^{-5} %(w/v) biotin, 0.004%(w/v) histidine) ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหาร BMMH (0.34%(w/v) yeast nitrogen base, 1%(w/v) ammonium sulphate, 100 mM potassium sulfate pH6.0, 0.5%(w/v) casamino acid, 0.5%(v/v) methanol, 4×10^{-5} %(w/v) biotin, 0.004%(w/v) histidine) ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เติมน้ำ 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นดูมาวัดกิจกรรมเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกโคโลนียีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

7. การเลี้ยง *P. pastoris* ให้ผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในปริมาณมาก

นำโคโลนียีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ได้มากที่สุดจากข้อ 6 มาเลี้ยงในระบบ shake flask โดยใช้อาหาร BMGH ปริมาตร 20 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นนำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออกมาเลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 150 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 150 ml นำไปเหวี่ยงอีกรอบด้วยความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMH ให้ได้ OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 10 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เติมน้ำ 0.5%(v/v) methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ และนำไปวัดกิจกรรมจนกระทั่งกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น จึงนำเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนอาหารไว้วิเคราะห์ในขั้นต่อไป

8. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

8.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ใน culture media และในการทำบริสุทธิ์

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ทำได้โดย คูดเชื้อมา 300 μ l แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นคูดเอาส่วนใสมา 250 μ l มาทำปฏิกิริยากับ 1 mM *p*NP-Glc แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 μ l ด้วย 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยากับ 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm ทำชุดควบคุมโดยใช้สารปริมาตรต่างๆดังที่กล่าวมา ยกเว้นเอนไซม์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับค่าในกราฟมาตรฐาน *p*NP (ภาพผนวก ก1)

8.2 การหาปริมาณเอนไซม์เพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านจลนพลศาสตร์และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

ใช้เอนไซม์ปริมาตร 2-8 μ l ทำปฏิกิริยากับ 15 mM *p*NP-Glc ปรับปริมาตรให้ได้ 100 μ l ด้วย 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm ทำชุดควบคุมโดยใช้สารปริมาตรต่างๆดังที่กล่าวมา ยกเว้นเอนไซม์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับค่าในกราฟมาตรฐาน *p*NP (ภาพผนวก ก2) และวาดกราฟปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทำกิจกรรมกับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมของเอนไซม์ (ภาพผนวกที่ ก3-ก9)

9. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์

นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่ผลิตเอนไซม์ดีลโคซิเนสกลายพันธุ์ไปกรองโดยใช้ ultrafiltration ที่มี molecular weight cutoff 30 kDa นำส่วนที่ได้จากการกรองไปผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose โดยต้องเติม ammonium sulfate ให้ได้ความเข้มข้น 1 M ก่อน ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 ที่มี 1 M ammonium sulfate จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 เก็บสารที่ชะได้เป็น fraction ทั้งหมด 10 fraction fraction ละ 2 ml และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วรวม fraction ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิสด้วย 10 mM sodium phosphate, pH 8.0 เพื่อเอาเกลือออกและปรับ pH จนได้ pH 8.0 และนำไปผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography (Ni^{2+} column) ล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl) แล้วชะ

คอลัมน์ด้วย elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) เก็บสารที่ชะได้เป็น fraction โดยเก็บ fraction ละ 1 ml จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วรวม fraction ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน นำเอนไซม์ที่ได้ไปผ่าน Amicon Ultra Centrifugal Filter ที่มี molecular weight cutoff 30 kDa เพื่อกำจัด imidazole ออก ละลายเอนไซม์ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 1 ml นำเอนไซม์ที่ได้แต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA ที่มีความเข้มข้น 0 - 25 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพผนวกที่ ก10)

10. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ (K_m , V_{max} และ k_{cat}) ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

นำเอนไซม์ต่างๆที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วปริมาณ 0.1 U ซึ่งหาได้จากวิธีทำข้อ 8.2 มาทดสอบกับดัลโคซินินกลูโคไซด์, ลินามาริน และ *p*NP-Glc ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเติม 0.1 M sodium acetate, pH 5.5 ให้ได้ปริมาตรรวม 50 μl บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มนาน 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม 2 mg/ml ABTS 50 μl และ 5 U/ml glucose oxidase reagent ปริมาตร 100 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายออกมา 180 μl ใส่ microplate แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (ภาพผนวกที่ ก11) เพื่อคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ และหาค่า K_m และ V_{max} จากโปรแกรม KaleidaGraph โดยใช้สมการของ Michaelis-Menten และคำนวณค่า k_{cat} โดยใช้สูตร จำนวนโมลทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ที่ได้/จำนวน โมลของเอนไซม์/เวลา (วินาที)

11. การศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

นำเอนไซม์ต่างๆที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ปริมาณ 0.1 U มาทดสอบปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัลโคซิเนส ดัลโคซิเนสธรรมชาติ และลินามาริน โดยใช้แอลกอฮอล์ (methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, และ *sec*-butanol) เข้มข้น 0.9 M เป็นตัวรับกลูโคส (glucose acceptor) และ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส (glucose donor) และปรับปริมาตรให้ได้ 100 μl ด้วย 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง (Thin-Layer Chromatography)

12. การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง

ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 11 มา 8 μl มาจุดลงบนแผ่น silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet ขนาดกว้าง 5.5 เซนติเมตร ยาว 7.2 เซนติเมตร โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 0.6 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลาย A (ethyl acetate: methanol: น้ำ 16:6:1) เป็นระยะทาง 4.25 เซนติเมตร 2 ครั้ง เพื่อแยกอัลคิลกลูโคไซด์ออกจาก *p*NP-Glc แล้วนำมาแช่ในสารละลาย P (*iso*-propanol: ethanol: น้ำ 5:1:2) เป็นระยะทาง 1.75 เซนติเมตรอีก 2 ครั้ง เพื่อให้กลูโคสเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น โดยในการจุ่มแต่ละครั้งจะต้องเป่าให้แห้ง จากนั้นนำไปจุ่มใน 20% (v/v) sulfuric acid ใน ethanol แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 125°C จนปรากฏจุดขึ้นบนแผ่น silica gel แล้วนำไปวัดความเข้มของแต่ละจุดเปรียบเทียบกับ standard ซึ่งประกอบด้วย glucose, methyl glucoside และ *p*NP-Glc ปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ โดยเครื่อง scanning densitometer รุ่น GS 800 (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.2.1 วิเคราะห์ปริมาณสารจากความเข้มของจุด

13. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

นำเอนไซม์ต่างๆที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล โดยใช้ 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel (ตารางที่ 3) โดยเติม 10%(w/v) ammonium persulfate และ TEMED ที่หลัง ส่วนตัวอย่างเตรียมโดยต้มเอนไซม์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์กับ 1x sample buffer (1%(w/v) SDS, 5%(w/v) glycerol, 1.25%(v/v) β -mercaptoethanol, 0.0025%(w/v) Coomassie blue G, 1.25 mM Tris, pH 6.8) เป็นเวลา 10 นาที ส่วน protein marker ต้มนาน 5 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่างและ protein marker ลงแต่ละช่อง แล้วนำเจลไปผ่านกระแสไฟฟ้า 30 mA ใน 1x running buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M glycine, 0.1%(w/v) SDS) นำเจลที่ได้ไปแช่ใน 50%(v/v) methanol นาน 30 นาที แล้วย้อมเจลด้วย staining solution (0.125%(w/v) Coomassie blue R, 45%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่เจลใน destaining solution (25%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid) เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 3 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

7.5% resolving gel		4% stacking gel	
น้ำกลั่น	2050 μ l	น้ำกลั่น	3050 μ l
30% T, 2.67% C polyacrylamide	1650 μ l	30% T, 2.67% C polyacrylamide	650 μ l
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1250 μ l	0.5M Tris-HCl pH 6.8	1250 μ l
10%(w/v) SDS	50 μ l	10%(w/v) SDS	50 μ l
10%(w/v) ammonium persulfate	50 μ l	10%(w/v) ammonium persulfate	50 μ l
TEMED	15 μ l	TEMED	10 μ l
Total	~ 5 ml	Total	~ 5 ml

14. การทำเวสต์เทิร์นอิมมูโนวิเคราะห์ (Immuno-Western blot)

นำตัวอย่างที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบด้วยเทคนิคเวสต์เทิร์นอิมมูโนวิเคราะห์ โดยนำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลมาแช่ใน 1x transfer buffer (10 mM Tris, 100 mM glycine) นาน 20 นาที และแช่ Polyvinylidene Fluoride transfer membrane ใน 100% methanol เป็นเวลา 5 วินาที และแช่ต่อใน 1x transfer buffer อีก 10 นาที ส่วนกระดาษกรองจำนวน 6 แผ่นแช่ใน 1x transfer buffer นาน 5 นาที นำไป blot ด้วยเครื่อง Trans-Blot® Semi-Dry (Bio-Rad, USA) โดยวางเมมเบรนบนกระดาษกรองที่หนา 3 ชั้น แล้ววางเจลบนเมมเบรนและวางต่อด้านกระดาษกรองอีก 3 ชั้น ย้ายโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 10 V นาน 30 นาที ต่อจากนั้นบ่มเมมเบรนกับ 5% skim milk ที่ละลายใน phosphate buffered saline plus tween, pH7.5 (PBST) (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl, 0.1% tween 20) เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วย PBST 2 ครั้ง และบ่มกับ mouse monoclonal antibody against natural dalcochinase ที่เจือจาง 1/5000 เท่าใน PBST เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ตามด้วย PBST อีก 15 นาที 1 ครั้ง และล้างต่ออีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำมาบ่มด้วย horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal antibody against mouse immunoglobulins ที่เจือจาง 1/5000 เท่าใน PBST เขย่านาน 1 ชั่วโมง นำออกมาล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ตามด้วย PBST 15 นาที 1 ครั้ง และล้างต่ออีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับเมมเบรนให้พอหมาดๆ แล้วบ่มกับ ECL plus Western Blotting Detection System นาน 5 นาที ซับให้พอหมาดๆ ห่อเมมเบรนด้วยพลาสติกใส แล้วนำไปประกบกับฟิล์มในห้องมืดนาน 30 วินาที และนำฟิล์มไปจุ่มใน developer ตามด้วย fixer และล้างด้วยน้ำกลั่น

15. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอนดิแนชเซอริงพอลิอะคริลาไมด์เจล

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอนดิแนชเซอริงพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยใช้ 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel (ตารางที่ 4) โดยเติม 10%(w/v) ammonium persulfate และ TEMED ที่หลัง ส่วนตัวอย่างเตรียมโดยผสมเอนไซม์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์กับ 1x sample buffer (10%(w/v) glycerol, 12.5%(w/v) bromophenol blue, 1.25 mM Tris, pH 6.8) จากนั้นหยอดตัวอย่างลงแต่ละช่อง แล้วนำเจลไปผ่านกระแสไฟฟ้า 90 mA ใน 1x running buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M glycine) นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside จากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูการเรืองแสงของแถบเอนไซม์ที่มีกิจกรรมของเบต้า-กลูโคซิเดส

ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอนดิแนชเซอริงพอลิอะคริลาไมด์เจล

7.5% resolving gel		4% stacking gel	
น้ำกลั่น	2248 μ l	น้ำกลั่น	2200 μ l
30% T, 2.67% C polyacrylamide	1250 μ l	30% T, 2.67% C polyacrylamide	500 μ l
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1250 μ l	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1250 μ l
10%(w/v) ammonium persulfate	50 μ l	10%(w/v) ammonium persulfate	50 μ l
TEMED	15 μ l	TEMED	10 μ l
		0.2 M EDTA, pH 6.9	50 μ l
Total	~4.8 ml	Total	~4 ml

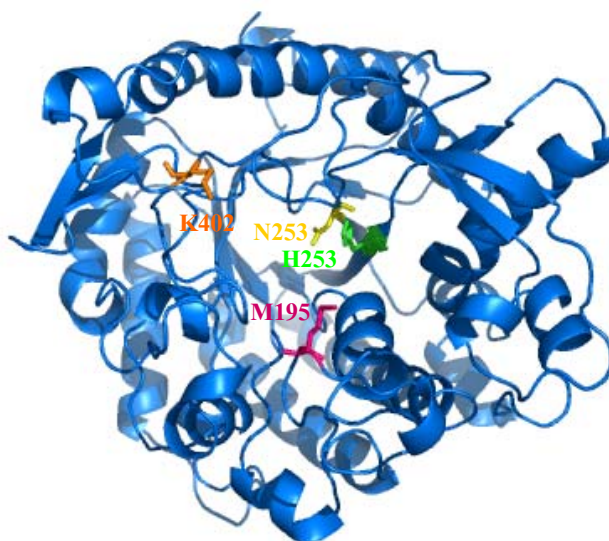
ผลและวิจารณ์

1. การหาตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

จากการเปรียบเทียบลำดับอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalW (ภาพที่ 15) และพิจารณาโครงสร้างจำลองของเอนไซม์คัลโคซิเนสที่ได้มาจากโปรแกรม Geno3D (ภาพที่ 16) เพื่อหาตำแหน่งอะมิโนที่แตกต่างกัน และมีแขนงข้างยื่นเข้าไปในช่องจับอะไกลโคโคน (aglycone binding pocket) จึงได้ทำการเลือกตำแหน่งที่จะกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ 4 ตำแหน่ง ดังนี้

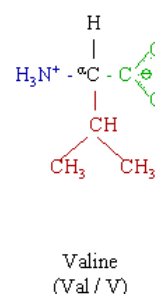
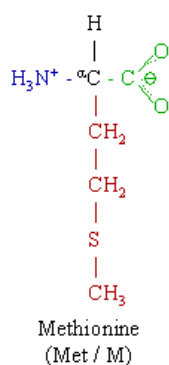
		182	190	200	210	220	230	
TRglu	177	WITLNEPSIFTANGYAGM	FAPGRCSPSYNPTCTGGDAGTETYLVAHNILILSHAATVQVY	236				
CVLM	193	WMTFNEPSAYVGFHDDGV	FAPGRCSSWVNRQCLAGDSATEPYIVAHNLLLSHAAAVHQY	252				
		240	250	260	270	280	290	
TRglu	237	KRKYQEHQKGTIGISLHV	VWVIPLSNSTSDQNATQRYLDFTCGWFMDPLTAGRYPDSMQY	296				
CVLM	253	RKYYQGTQKGKIGITLFT	FWYEPLSDSKVDVQAAKTALDFMFLWMDPMTYGRYPRTMVD	312				
		300	310	320	330	340	350	
TRglu	297	LVGDRLPKFTTDQAKLVKGSFDFIGL	NYTTNYATKSDASTCCPPSYLTDPQVTLL-QQ-	354				
CVLM	313	LAGDKLIGFTDEESQLLRGSYDFVGLQ	YYTAYYAEPIPPVDPKFRRYKTDSGVNATPYD-	371				
		360	370	380	390	396	400	410
TRglu	355	RNGVFIGPVTPSGWMCIIYPKGLRDLLLYFKEKYNNPLVYITENGIDEKNDAS--LSLEES	412					
CVLM	372	LNGNLIGPQAYSSWFYIFPKGIRHFLNYTKDTYNPVIYVTENGVDNYNNE--QPIEEA	429					

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างคัลโคซิเนส (TRglu) และลินามาเรส (CVLM) ตำแหน่งที่แรเงาและหนาเป็นตำแหน่งที่จะทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ



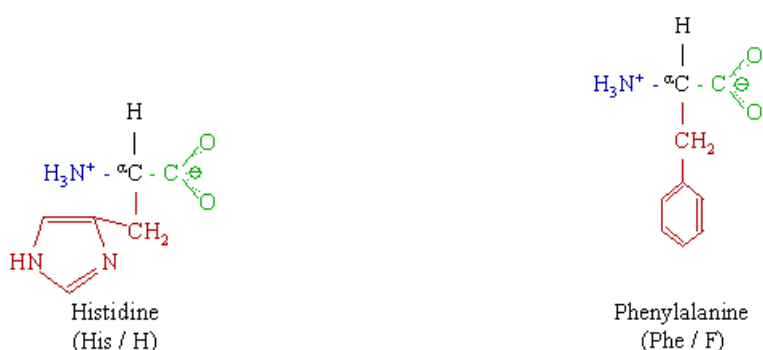
ภาพที่ 16 โครงสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนส และตำแหน่ง M195, H253, N253 และ K402 ในช่องจับอะไกลโคนที่จะทำการกลายพันธุ์

1) เมไธโอนีน (methionine) ตำแหน่งที่ 195 ของคัลโคซิเนสเปลี่ยนเป็นเวลีน (valine) (ภาพที่ 17) เรียกว่า M195V การเปลี่ยนเมไธโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างยาวและมีขั้ว เป็นเวลีนที่มีแขนงข้างสั้นและไม่มีขั้ว คาดว่าจะเป็นการลดความเกะกะของแขนงข้าง (steric hindrance) และเป็นการเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ให้แก่บริเวณจับอะไกลโคน ทำให้เอนไซม์สามารถจับกับหมู่อะไกลโคนของลินามาริน และ *pNP*-Glc ได้ดีขึ้น และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้ดีกว่าคัลโคซิเนสธรรมชาติ เนื่องจากความเกะกะของแขนงข้างที่สั้นลงทำให้แอลกอฮอล์สายยาวเข้ามาจับหมู่ น้ำตาลได้ดีขึ้น



ภาพที่ 17 โครงสร้างกรดอะมิโนเมไธโอนีน และเวลีน

2) ฮิสติดีน (histidine) ตำแหน่งที่ 253 ของคัลโคซิเนสเปลี่ยนเป็นเฟนิลอะลานีน (phenylalanine) (ภาพที่ 18) เรียกว่า H253F การแทนที่ฮิสติดีนด้วยเฟนิลอะลานีนเป็นการเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกให้แก่ช่องจับอะไคโดโคน ทำให้เอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรทพวกที่มีหมู่ อะไคโดโคนที่เป็นพวกไฮโดรโฟบิกได้ดี และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อทำการกลายพันธุ์ ตำแหน่งที่สอดคล้องกันนี้ในลินามาเรส (F269N) พบว่าค่า K_m คอลินามารินเพิ่มขึ้นถึง 16 เท่า แสดงว่า F269 ในลินามาเรสน่าจะมีความสำคัญในกำหนดความจำเพาะในการจับกับสับสเตรทของ ลินามาเรส (Keresztessy *et. al.*, 2001) จึงคาดว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F น่าจะสามารถจับ และสลายลินามารินได้ และสามารถเกิดปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีเหมือนกับลินามาเรส



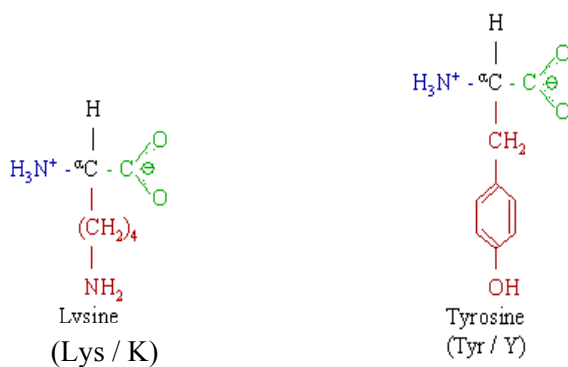
ภาพที่ 18 โครงสร้างกรดอะมิโนฮิสติดีน และเฟนิลอะลานีน

3) แอสปาราจีน (asparagine) ตำแหน่งที่ 323 ของคัลโคซิเนสเปลี่ยนเป็นกลูตามีน (glutamine) (ภาพที่ 19) เรียกว่า N323Q ซึ่งตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ใน glycosyl hydrolase family1 และมีการศึกษาตำแหน่งที่สอดคล้องกันนี้ในลินามาเรส คือเปลี่ยนจากกลูตามีนเป็นกรด กลูตามิก พบว่ากิจกรรมในการสลายลินามาริน และ *p*NP-Glc ลดลงมาก เนื่องจากกลูตามีนใน ตำแหน่งนี้มีอันตรกิริยา (interaction) กับกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ทำให้กรดกลูตามิกในตำแหน่งที่ 413 และ 198 ซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile และ acid/base catalyst ตามลำดับ อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง และทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงคาดว่าตำแหน่งนี้น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวกับการ รักษาโครงสร้างในลินามาเรส (Keresztessy *et. al.*, 2001) ดังนั้นถ้าทำการเปลี่ยนตำแหน่งที่ สอดคล้องกันนี้ในคัลโคซิเนสให้เหมือนลินามาเรส คือเปลี่ยนแอสปาราจีนตำแหน่งที่ 323 ให้เป็น กลูตามีน คาดว่าเอนไซม์ N323Q น่าจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายลินามารินได้ และเมื่อ พิจารณาโครงสร้างแอสปาราจีนกับกลูตามีนแล้ว จะเห็นได้ว่าทั้งกลูตามีน และแอสปาราจีนต่างก็ เป็นกรดอะมิโนชนิดที่มีขั้ว และกลูตามีนมีแขนงข้างที่ยาวกว่าจึงน่าจะเข้าถึงลินามาริน และ *p*NP-Glc ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าคัลโคซิซินิกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น และทำให้เอนไซม์ N323Q สามารถสลาย ลินามาริน และ *p*NP-Glc ได้ และสามารถเกิดปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีเหมือนลินามาเรส



ภาพที่ 19 โครงสร้างกรดอะมิโนแอสปาราจีน และกลูตามีน

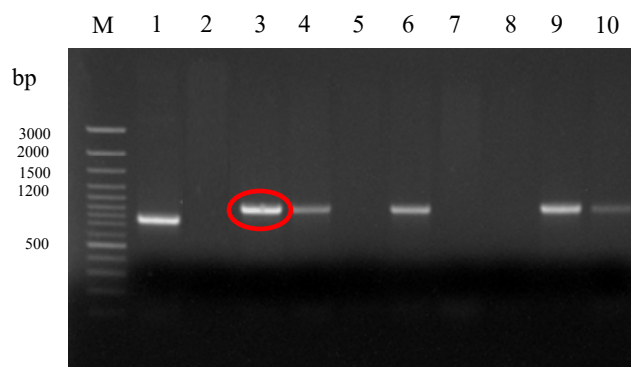
4) ไลซีน (lysine) ตำแหน่งที่ 402 ของคัลโคซินเปลี่ยนเป็นไทโรซีน (tyrosine) (ภาพที่ 20) เรียกว่า K402Y การเปลี่ยนไลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทมีขั้วบวก และมีแขนงข้างยาว ไปเป็นไทโรซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างสั้น และมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (lone pair electron) เหลืออยู่ ซึ่งน่าจะมีส่วนร่วมในการเข้าจับกับส่วนอะไกลโคนของสับสเตรท *p*NP-Glc และลินามารินได้ดี และไม่ไปขัดขวางการเข้าจับของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y กับ *p*NP-Glc ลินามาริน และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ จึงคาดว่า K402Y น่าจะเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทเหล่านี้ได้ดี และเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีกว่าคัลโคซินธรรมชาติ



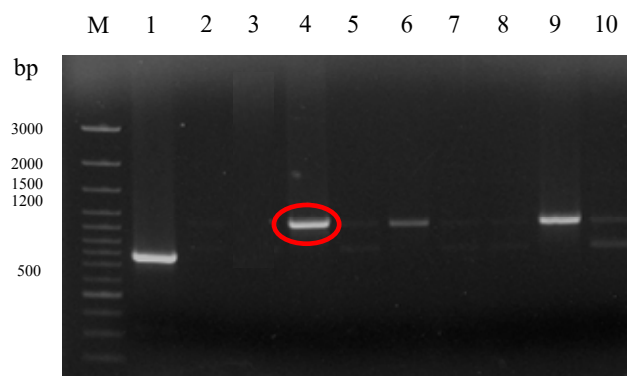
ภาพที่ 20 โครงสร้างกรดอะมิโนไลซีน และไทโรซีน

2. การทำการกลายพันธุ์เอนไซม์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

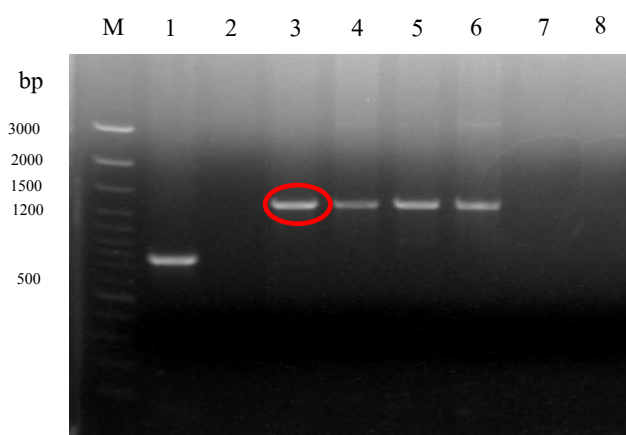
การทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG เป็นต้นแบบ จากนั้นทำการถ่ายยีนตัดโคจีนในสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี electroporation และเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB, pH 7.5 ที่มี zeocin เข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการสุ่มเลือกโคโลนีมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อตรวจหายีนตัดโคจีนในสกลายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเพื่อตรวจสอบโดยเฉพาะ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากผลการทดลองพบว่า M195V โคโลนีที่ 2, 3, 5, 8 และ 9 ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 900 bp (ภาพที่ 21), H253F โคโลนีที่ 3, 5 และ 8 ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,000 bp (ภาพที่ 22), N323Q โคโลนีที่ 2-5 ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,300 bp (ภาพที่ 23) และ K402Q โคโลนีที่ 4 ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1,500 bp (ภาพที่ 24) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดผลิตภัณฑ์ที่คาดไว้ คือ 931 bp, 1,105 bp, 1,315 bp และ 1552 bp ตามลำดับ แสดงว่าโคโลนีเหล่านี้จะมียีนตัดโคจีนในสกลายพันธุ์ตามที่คาดไว้



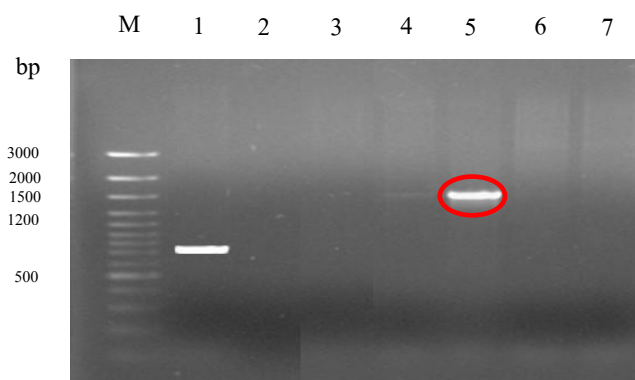
ภาพที่ 21 1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคโลนี *E. coli* (DH5 α) ที่ได้รับการถ่ายยีนตัดโคจีนในสกลายพันธุ์ M195V โดย M: 100 bp marker, lane 1: negative control (พลาสมิดที่มียีนตัดโคจีนในสกลายพันธุ์เดิม), lane 2-10 M195V โคโลนีที่ 1-9



ภาพที่ 22 1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคลินี *E. coli* (DH5α) ที่ได้รับการถ่ายยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ H253F โดย M: 100 bp marker, lane 1: negative control (พลาสมิดที่มียีนดัดโคชินเนสดั้งเดิม), lane 2-10: H253F โคลินีที่ 1-9

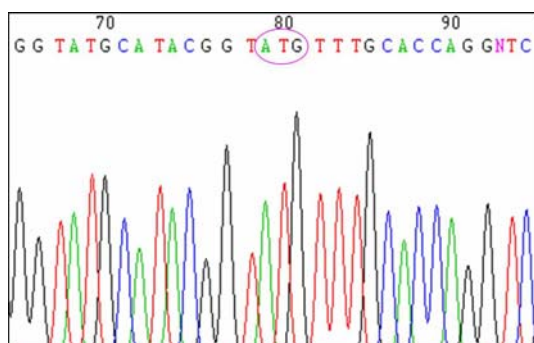


ภาพที่ 23 1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคลินี *E. coli* (DH5α) ที่ได้รับการถ่ายยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ N323Q โดย M: 100 bp marker, lane 1: negative control (พลาสมิดที่มียีนดัดโคชินเนสดั้งเดิม), lane 2-8: N323Q โคลินีที่ 1-7

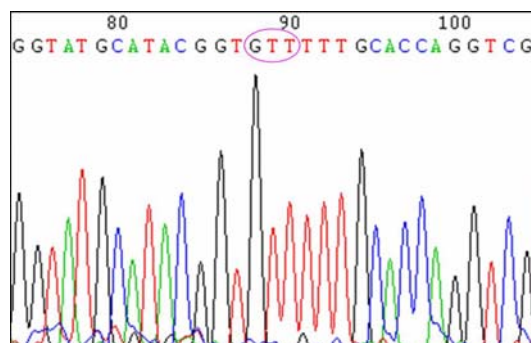


ภาพที่ 24 1% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจากโคโลนี *E. coli* (DH5α) ที่ได้รับการถ่ายยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ K402Y โดย M: 100 bp marker, lane 1: negative control (พลาสมิดที่มียีนดัดโคชินเนสดั้งเดิม), lane 2-7: K402Y โคโลนีที่ 1-6

ดังนั้นจึงเลือกสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ 2 ของ M159V, โคโลนีที่ 3 ของ H253F, โคโลนีที่ 2 ของ N323Q และโคโลนีที่ 4 ของ K402Y ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เพื่อยืนยันผลการตรวจหายีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ ซึ่งผลการตัดเป็นไปตามที่คาดไว้ คือได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1.4 kb และ 3.8 kb ก่อนที่จะส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อตรวจสอบผลการกลายพันธุ์ (ภาพที่ 25-28) ผลการหาลำดับเบสทั้งหมดแสดงในภาคผนวกที่ ข-จ ซึ่งพบว่าลำดับเบสทั้งหมดถูกต้อง

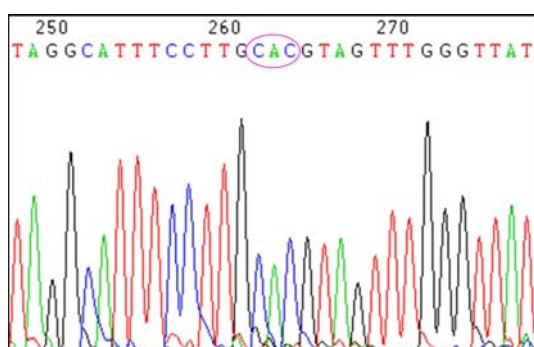


(a)

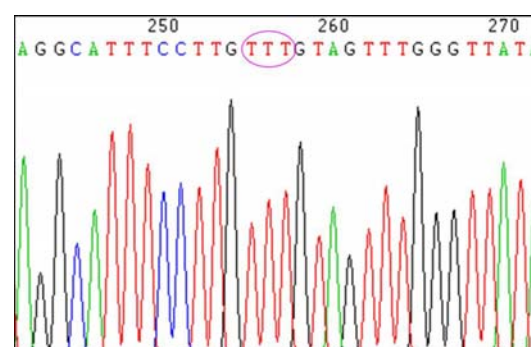


(b)

ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V (a) ยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่มี ATG ซึ่งเป็นโคดอนของเมไทโอนีน และ (b) ยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V ที่มี GTT ซึ่งเป็นโคดอนของวาลีน ตำแหน่งที่วงกลมเป็นตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์

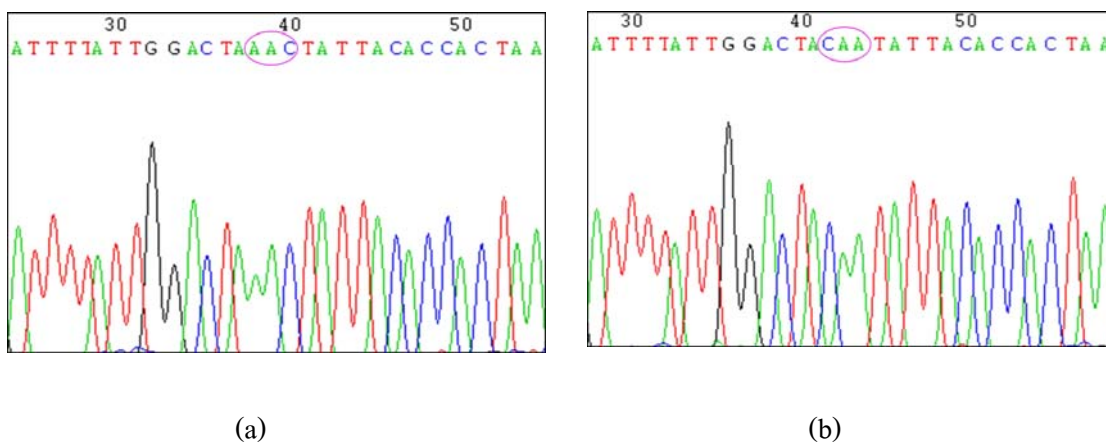


(a)

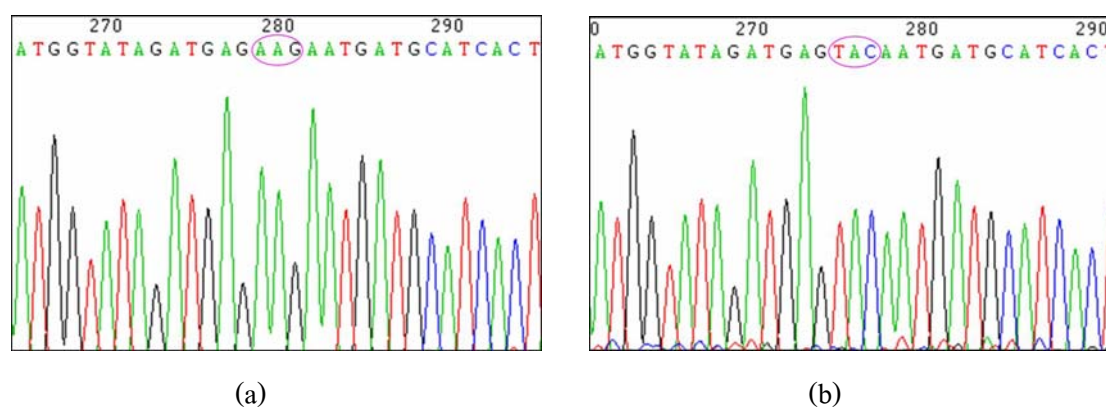


(b)

ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F (a) ยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่มี CAC ซึ่งเป็นโคดอนของฮิสติดีน และ (b) ยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F ที่มี TTT ซึ่งเป็นโคดอนของฟีนิลอะลานีน ตำแหน่งที่วงกลมเป็นตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์



ภาพที่ 27 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q (a) ยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่มี AAC ซึ่งเป็นโคดอนของแอสปารากิน และ (b) ยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q ที่มี CAA ซึ่งเป็นโคดอนของกลูตามีน ตำแหน่งที่วงกลมเป็นตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์



ภาพที่ 28 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส และยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y (a) ยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่มี AAG ซึ่งเป็นโคดอนของไลซีน และ (b) ยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y ที่มี TAC ซึ่งเป็นโคดอนของไทโรซีนตำแหน่งที่วงกลมเป็นตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์

3. การผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

ทำการถ่ายยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *P. pastoris* โดยวิธี electroporation แล้วเลี้ยงบนอาหาร YPDS ที่มี zeocin เข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นเลือกโคโลนีเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกตัว มาเลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลาข้ามคืน แล้วเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหาร BMMH ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm และเติม 0.5% methanol ทุกๆ 24 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc พบว่าโคโลนี M195V5 H253F3 N323Q8 และ K402Y1 มีการแสดงออกของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์มากที่สุด (ตารางที่ 5-8) ดังนั้นจึงเลือกโคโลนีเหล่านี้มาเลี้ยงในระบบ shake flask เพื่อให้ได้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในปริมาณมากต่อไป

ตารางที่ 5 โคโลนียีสต์ *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อ pNP-Glc

ชื่อ โคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
M195V1	2.104
M195V2	2.204
M195V3	2.262
M195V4	2.198
M195V5	2.646
M195V6	2.334
M195V7	1.828
M195V8	2.612
M195V9	0.344
M195V10	1.852
M195V11	1.882
M195V12	2.420
M195V13	2.538
M195V14	2.512
M195V15	2.462
M195V16	2.480

ตารางที่ 6 โคลนีนีฮีสต์ *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อ pNP-Glc

ชื่อโคลนีนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
H253F1	1.680
H253F2	2.270
H253F3	2.922
H253F4	2.356
H253F5	1.936
H253F6	2.078
H253F7	2.254
H253F8	0.194

ตารางที่ 7 โคลนีนีฮีสต์ *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อ pNP-Glc

ชื่อโคลนีนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
N323Q1	0.507
N323Q2	1.121
N323Q3	0.134
N323Q4	0.789
N323Q5	0.491
N323Q6	0.432
N323Q7	0.522
N323Q8	1.158
N323Q9	0.803

ตารางที่ 8 โคโลนียีสต์ *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อ *pNP-Glc*

ชื่อโคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm
K402Y1	1.396
K402Y1	1.237
K402Y1	1.335

4. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์

นำ culture media ที่ได้จากการเลี้ยง *P. pastoris* ไปทำบริสุทธิ์ โดยนำไปผ่าน ultrafiltration ที่มี molecular weight cutoff 30 kDa คอลัมน์ phenyl sepharose คอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography และ Amicon Ultra Centrifugal Filter ที่มี molecular weight cutoff 30 kDa หลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นต้องทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ 1 mM *pNP-Glc* ดังที่ได้อธิบายไว้ในวิธีการทดลอง ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดสรุปไว้ในตารางที่ 9-12 โดยเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V H253F N323Q และ K402Y ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.93, 11.49, 11.80 และ 5.37 เท่า ตามลำดับ และได้ผลผลิตทั้งหมด 9.42%, 16.78%, 19.20% และ 20.41% ตามลำดับ จากนั้นนำเอนไซม์ทั้งหมดที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล เวสเทิร์นอิมมูโนโบลอต และอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอนดีแนชเซอริงพอลิอะคริลาไมด์เจล

ตารางที่ 9 ตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V ต่อปริมาตร culture 1 ลิตร

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture media	101.73	242.45	0.42	1.00	100.00
Ultrafiltration	95.93	176.60	0.54	1.29	94.29
Phenyl sepharose	33.41	57.86	0.58	1.38	32.84
Ni ²⁺ -ion chromatography	15.51	23.44	0.66	1.58	15.24
Amicon filtration	9.58	7.78	1.23	2.93	9.42

ตารางที่ 10 ตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F ต่อปริมาตร culture 1 ลิตร

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture media	44.69	396.23	0.11	1.00	100.00
Ultrafiltration	37.51	239.34	0.16	1.39	83.92
Phenyl sepharose	18.93	48.74	0.39	3.44	42.35
Ni ²⁺ -ion chromatography	12.39	17.99	0.69	6.11	27.73
Amicon filtration	7.50	5.79	1.30	11.49	16.78

ตารางที่ 11 ตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N3213Q ต่อปริมาตร culture 1 ลิตร

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture media	42.13	486.79	0.09	1.00	100.00
Ultrafiltration	41.27	286.16	0.14	1.67	97.97
Phenyl sepharose	34.23	50.75	0.67	7.79	81.24
Ni ²⁺ -ion chromatography	17.37	32.23	0.54	6.23	41.24
Amicon filtration	8.09	7.92	1.02	11.80	19.20

ตารางที่ 12 ตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y ต่อปริมาตร culture 1 ลิตร

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture media	36.86	160.38	0.23	1.00	100.00
Ultrafiltration	49.45	92.45	0.53	2.33	134.16
Phenyl sepharose	23.81	34.43	0.69	3.01	64.59
Ni ²⁺ -ion chromatography	14.09	12.00	1.17	5.11	38.23
Amicon filtration	7.53	6.10	1.23	5.37	20.41

จากตารางที่ 9-12 เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลอง คือมีปริมาณ 9.58, 7.50, 8.09 และ 7.53 U ต่อปริมาตร culture 1 ลิตร สำหรับเอนไซม์ M195V H253F N323Q และ K402Y ตามลำดับ

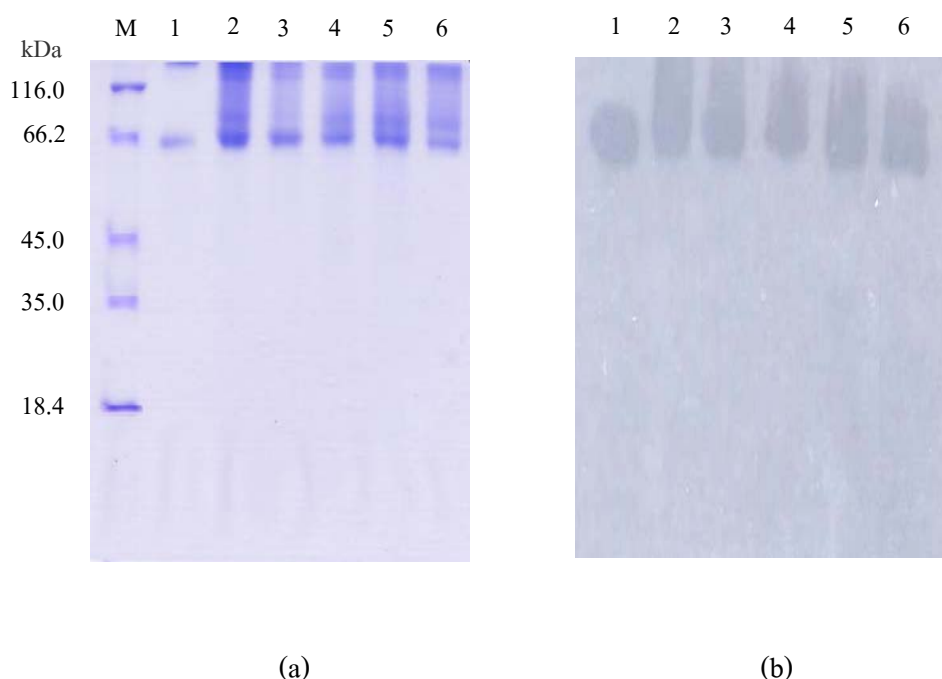
เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ออก (%yield) จากตาราง 12 ในขั้นหลังผ่าน ultrafiltration พบว่ามีค่ามากกว่า 100% คือมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 134.16% อาจเนื่องมาจากใน culture media ของ K402Y อาจมีตัวยับยั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น หลังทำบริสุทธิ์ผ่านขั้น ultrafiltration แล้วพบว่าตัวยับยั้งอาจถูกกรองออกไป ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่ามากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกิจกรรมทั้งหมด (total activity) มีค่าสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิด ได้แก่ M195V H253F N323Q และ K402Y หลังผ่านการทำ amicon filtration (7.78, 5.79, 7.92 และ 6.01 mg ตามลำดับ) มีปริมาณน้อยกว่าขั้นหลังผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography (23.44, 17.99, 32.23 และ 12.00 mg ตามลำดับ) ทั้งๆที่ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในทั้งสองขั้นนี้ควรเท่ากัน เนื่องจากโปรตีนที่ได้ผ่านขั้น ultrafiltration มาก่อนแล้ว ควรมีขนาดใหญ่กว่า molecular weight cutoff ของ ultrafiltration membrane คือ 30 kDa ซึ่งมีขนาดเท่ากับ molecular weight cutoff ของ amicon ultra filter เช่นกัน ดังนั้นขั้นกรองโปรตีนผ่าน amicon ultra filter จึงเป็นการกำจัด imidazole ออกไปเท่านั้น ฉะนั้นปริมาณโปรตีนทั้งหมดหลังผ่าน amicon ultra filter ควรมีค่าเท่าเดิม การที่ปริมาณโปรตีนลดลงอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีนเอสในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ทำให้โปรตีนถูกตัดจนมีขนาดเล็กกว่า 30 kDa และลอดผ่าน amicon ultra filter ไป หรืออาจมีการรั่วของโปรตีนในขั้นนี้ หรือโปรตีนอาจติดค้างอยู่ที่เมมเบรนของ amicon ultra filter ทำให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดลดลง ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดลดลง และค่า specific activity ก็ลดลงด้วยเช่นกัน

เมื่อพิจารณาค่า specific activity ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ในขั้นหลังผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography พบว่ามีค่าลดลง (ตารางที่ 11) อาจเนื่องมาจากในขั้นล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer หลังผ่านเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ลงในคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ใช้ปริมาณ wash buffer ไม่เพียงพอที่จะล้างโปรตีนอื่นๆที่ไม่ต้องการออก จึงทำให้โปรตีนที่ไม่ต้องการค้างอยู่ในคอลัมน์ เมื่อทำการชะคอลัมน์แล้ว ทำให้มีโปรตีนอื่นปนออกมาด้วย ค่าโปรตีนทั้งหมดที่หาได้จึงมีค่ามากกว่าที่ควรจะเป็น หรือกิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ลดลงมาก จึงทำให้ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ลดลง ส่งผลให้ค่า specific activity และ purification fold ดำดิ่งไปด้วย

เมื่อวิเคราะห์เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมด์เจลเทียบกับดัลโคซินธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์ดัลโคซิน (H18) พบว่าทั้ง H18

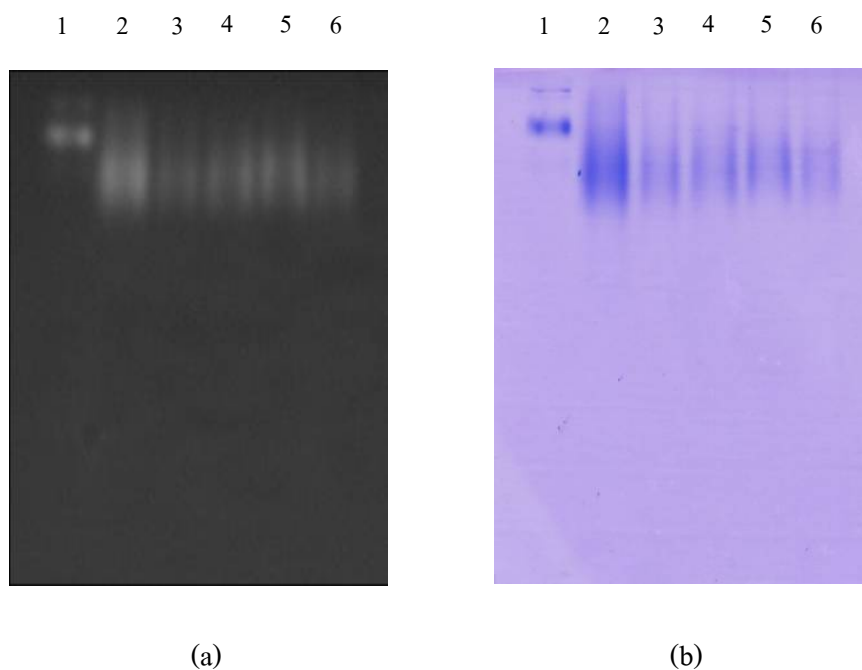
และดัลโคซินะสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดปรากฏแถบโปรตีนที่มีลักษณะเป็นปื้น และไม่คมชัด ที่มีขนาดประมาณ 66 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับดัลโคซินะสธรรมชาติที่ปรากฏแถบคมชัด (ภาพที่ 29 (a)) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการเติมน้ำตาล (glycosylation) ที่แตกต่างกันระหว่างโปรตีนที่ถูกผลิตมาจากยีสต์กับพืช และมีการรายงานว่ายีสต์ *P. pastoris* สามารถเติมหมู่น้ำตาลได้ทั้งแบบ N-linked glycan และ O-linked glycan โดยการเติมน้ำตาลแบบ O-linked glycan ไม่มีลำดับที่แน่นอนจึงมีการเติมน้ำตาลบนสายโปรตีนแตกต่างกัน และยังมีการเติมน้ำตาลแมนโนส (mannose) ที่ปลายสาย N-linked core ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) มากถึง 50-150 ตัว จึงทำให้สายโปรตีนที่สร้างได้จากยีสต์มีน้ำตาลมากกว่าพืช (hyperglycosylation) และมีการเติมน้ำตาลที่แตกต่างกันสำหรับโปรตีนชนิดเดียวกันที่ผลิตขึ้นจากยีสต์ (Cereghino and Cregg, 2000) ซึ่งน้ำตาลนี้เองจะไปขัดขวางการจับกันระหว่าง SDS กับแอนไทม์ ทำให้รีคอมบิแนนท์ดัลโคซินะส และดัลโคซินะสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดมีประจุบวกลดน้อยกว่าดัลโคซินะสธรรมชาติ จึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดัลโคซินะสธรรมชาติทำให้แถบโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE มีขนาดใหญ่กว่าที่เป็นจริง และมีลักษณะเป็นปื้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า ดัลโคซินะสธรรมชาติมีน้ำตาลน้อยกว่ารีคอมบิแนนท์ดัลโคซินะส (H18) คือ 13.6% และ 16.1% ตามลำดับ (Toonkool *et.al.*, 2006) และเมื่อนำแอนไทม์ดัลโคซินะสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์ดัลโคซินะส และดัลโคซินะสกลายพันธุ์ทั้งหมดไปวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blot พบว่าโปรตีนทุกชนิดปรากฏแถบบนฟิล์ม แสดงว่าแอนไทม์ทุกชนิดเป็นแอนไทม์ดัลโคซินะส เนื่องจากสามารถจับกับ mouse monoclonal antibody against natural dalcocchinase ได้ (ภาพที่ 29 (b))



ภาพที่ 29 การวิเคราะห์โปรตีนของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Western blot (a) อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งย้อมด้วย Coomassie brilliant blue และ (b) Western blot ซึ่งแสดงผลบนแผ่นฟิล์ม M: protein marker (kDa), lane 1: คัลโคซิเนสธรรมชาติ, Lane 2: รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส, Lane 3: M195V, Lane 4: H253F, Lane 5: N323Q, Lane 6: K402Y

เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส (H18) และเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิด โดยใช้เอนไซม์อย่างละ 0.3 U แล้วย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (4 MU-Glc) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดแสดงกิจกรรมต่อสับสเตรท 4-MU-Glc ต่างกัน (ภาพที่ 30 (a)) และพบว่าปริมาณโปรตีนของเอนไซม์แต่ละชนิดไม่เท่ากัน (ภาพที่ 30 (b)) ทั้งๆที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.3 U เท่ากันทุกตัว อาจเป็นเพราะกิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดไม่เท่ากัน ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่ปรากฏจึงต่างกัน โดยที่เอนไซม์ H18 ดูเหมือนว่าจะมีปริมาณโปรตีนมากที่สุด รองลงมาคือเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V H253F และ N323Q ซึ่งมีปริมาณโปรตีนพอๆกัน และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาจากภาพ 30 (b) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ต่อสับสเตรท 4 MU-Glc เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 30 (a) พบว่าเอนไซม์ H18 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ 4 MU-Glc สูงสุด รองลงมาคือเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V H253F และ N323Q ซึ่งดูว่าจะแสดงกิจกรรมต่อ 4 MU-Glc พอๆกัน

และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y แสดงกิจกรรมต่อ 4 MU-Glc ต่ำที่สุด จากผลข้างต้นจึงคาดว่า กิจกรรมของเอนไซม์ต่อ 4 MU-Glc น่าจะขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีน



ภาพที่ 30 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอนตีแนชเซอริงฟอสโฟริลอะครีลาไมด์เจล (a) ย้อมด้วย 4 MU-Glc (b) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue Lane: 1 คัตโคชินธรรมชาติ, Lane 2: รีคอมบิแนนท์คัตโคชิน, Lane 3: M195V, Lane 4: H253F, Lane 5: N323Q, Lane 6: K402Y

5. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัตโคชินธรรมชาติ H18 M195V H253F N323Q K402Y และลินามารีนในการสลาย *p*NP-Glc คัตโคซินินกลูโคไซด์ และลินามารีน แสดงในตารางที่ 13 และ 14 (กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์แต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก จ)

ตารางที่ 13 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทุกชนิดในการสลาย *p*NP-Glc

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$V_{\max} \pm \text{S.E. (mU)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
M195V	1.77±0.16	230.62±4.41	36.38	20.54
H253F	2.69±0.30	235.72±6.57	58.01	21.56
N323Q	1.84±0.18	227.12±4.30	36.21	19.65
K402Y	2.61±0.24	250.88±5.25	15.49	5.94
H18	3.91±0.46	226.80±4.59	237.01	60.46
ดัลโคซิเนสธรรมชาติ	3.92±0.31	215.78±7.15	261.09	66.78
ลินามารเอส	0.72±0.04	206.55±1.62	131.91	183.20

หมายเหตุ S.E. คือ Standard error ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ Michaelis-Menten

ตารางที่ 14 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทุกชนิดในการสลายดัลโคซินินกลูโคไซด์

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$V_{\max} \pm \text{S.E. (mU)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
M195V	0.37±0.06	31.35±1.25	4.27	11.54
H253F	1.51±0.25	32.25±2.14	7.22	4.78
N323Q	0.94±0.09	31.13±0.96	2.82	3.00
K402Y	0.27±0.03	14.22±0.26	3.29	12.19
H18	1.51±0.26	26.36±1.77	34.84	41.98
ดัลโคซิเนสธรรมชาติ	0.83±0.17	33.34±2.14	31.90	21.12
ลินามารเอส	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

หมายเหตุ N.D. คือ ไม่สามารถหาค่าได้

S.E. คือ Standard error ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ Michaelis-Menten

จากตารางที่ 13 และ 14 เมื่อพิจารณาค่าทางจลนพลศาสตร์พบว่าค่า K_m และ k_{cat} ของทั้งเอนไซม์ H18 และดัลโคซิเนสธรรมชาติดีค่าใกล้เคียงกันต่อทั้งสับสเตรทที่เป็น *p*NP-Glc และดัลโคซินินกลูโคไซด์ โดยที่ค่า K_m ของ H18 และดัลโคซิเนสธรรมชาติต่อ *p*NP-Glc มีค่าเท่ากับ 3.91 mM และ 3.92 mM ซึ่งมีค่าน้อยกว่าที่เคยรายงานไว้ คือ 5.78 mM และ 5.37 mM (Toonkool *et al.*, 2006) ตามลำดับ และค่า K_m ของ H18 และดัลโคซิเนสธรรมชาติต่อดัลโคซินินกลูโคไซด์มี

ค่าเท่ากับ 1.51 mM และ 0.83 mM ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้ คือ 1.48 mM และ 1.68 mM ตามลำดับ (Toonkool *et al.*, 2006) ส่วนค่า k_{cat} ของ H18 และคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อ *p*NP-Glc มีค่าเท่ากับ 237.01 s^{-1} และ 261.09 s^{-1} ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าค่า k_{cat} ของคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อ *p*NP-Glc ที่มีรายงานไว้ คือ 307 s^{-1} (Srisomsap *et al.*, 1996) และค่า k_{cat} ของ H18 และคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อคัลโคซินินกลูโคไซด์มีค่าเท่ากับ 34.84 s^{-1} และ 31.09 s^{-1} ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า k_{cat} ของคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อคัลโคซินินกลูโคไซด์ที่เคยมีรายงานไว้ คือ 328.05 s^{-1} (Svasti *et al.*, 1999) ส่วนค่า k_{cat}/K_m ของ H18 และคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อ *p*NP-Glc มีค่าใกล้เคียงกัน คือ $60.46 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ และ $66.78 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ และ k_{cat}/K_m ของคัลโคซิเนสธรรมชาติต่อคัลโคซินินกลูโคไซด์ ($21.12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) น้อยกว่า k_{cat}/K_m ของ H18 ต่อคัลโคซินินกลูโคไซด์ ($41.98 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการวัดที่แตกต่างกัน และเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่ใช้ในการทดลองเป็นคนละชุดกัน นอกจากนี้คัลโคซินินกลูโคไซด์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความบริสุทธิ์น้อยจึงทำให้ปริมาณ คัลโคซินินกลูโคไซด์ที่ใช้มีความคลาดเคลื่อน จึงอาจส่งผลให้ค่า k_{cat} ที่ได้คลาดเคลื่อน ในการทดลองนี้จะศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับ H18 เนื่องจากเป็นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ผลิตในยีสต์ ดังนั้นจึงน่ามีกระบวนการเติมน้ำตาลที่เหมือนกัน และได้มาจากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเดียวกัน

เมื่อพิจารณาค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดต่อ *p*NP-Glc เปรียบเทียบกับ H18 พบว่าค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V (1.77 mM) และเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q (1.84 mM) มีค่า K_m ลดลง 2 เท่า และเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F (2.69 mM) และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y (2.61 mM) มีค่า K_m ลดลง 1.5 เท่า แสดงว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดสามารถจับกับสับสเตรท *p*NP-Glc ได้ดีกว่า H18 โดยที่เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V และเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q สามารถจับกับสับสเตรท *p*NP-Glc ได้ดีกว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y

เมื่อพิจารณาค่า V_{max} ของเอนไซม์ทุกชนิดต่อ *p*NP-Glc แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกัน เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc เท่ากัน คือ 0.1 U และค่า V_{max} ไม่ได้พิจารณาจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาร่วมด้วย ดังนั้นค่า V_{max} จึงไม่สามารถบอกความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ จึงพิจารณาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้ค่า k_{cat} แทน เมื่อเปรียบเทียบค่า k_{cat} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดต่อ *p*NP-Glc เปรียบเทียบกับ H18 พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีค่า k_{cat} ลดลง โดยที่เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y มีค่า k_{cat} (15.49 s^{-1}) ลดลงมากถึง 16 เท่า ส่วนค่า k_{cat} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V

(36.38 s⁻¹) และเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q (36.21 s⁻¹) ลดลงประมาณ 7 เท่า และค่า k_{cat} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F (58.01 s⁻¹) ลดลง 4.3 เท่า แสดงว่าเมื่อทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเหล่านี้แล้วจะทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้แย่ง โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง K402 ได้รับผลกระทบมากที่สุด ซึ่งให้เห็นว่าตำแหน่ง K402 น่าจะมีความสำคัญในทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย *p*NP-Glc มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยพิจารณาจากค่า k_{cat} / K_m พบว่าประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับ H18 และดัลโคซินินกลูโคไซด์ โดยที่เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V H253F และ N323Q มีค่า k_{cat} / K_m ลดลงประมาณ 3 เท่า และ K402Y มีค่า k_{cat} / K_m ลดลงถึง 11 เท่า แสดงว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y มีประสิทธิภาพในการสลาย *p*NP-Glc แย่ที่สุด

เมื่อพิจารณาค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดต่อดัลโคซินินกลูโคไซด์เปรียบเทียบกับ H18 (1.51 mM) พบว่าค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V N323Q และ K402Y ลดลง แสดงว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถจับกับดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น โดยที่ค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V (0.37 mM) และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y (0.27 mM) ลดลงมากพอๆกัน คือ 4 เท่า และ 5.6 เท่า ตามลำดับ การที่เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V สามารถจับกับดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น อาจเนื่องมาจากการแทนที่เมธิโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างที่ยาวกว่าและมีขั้ว ด้วยวาลีนซึ่งมีแขนงข้างที่สั้นกว่าและไม่มีขั้ว จึงไม่ไปขัดขวางการเข้าจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรดดัลโคซินินกลูโคไซด์ ซึ่งมีหมู่อะไกลโคนที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ และมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง ทำให้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V สามารถจับกับดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้แน่นขึ้น และการที่เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y สามารถจับกับดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้แน่นมากขึ้น อาจเนื่องมาจากการแทนที่ไลซีนด้วยไทโรซีน ซึ่งไทโรซีนมีแขนงข้างที่สั้นกว่าจึงไม่ไปขัดขวางการเข้าจับกันของเอนไซม์กับดัลโคซินินกลูโคไซด์ และการที่ไทโรซีนมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหลืออยู่คาดว่าน่าจะมีส่วนในการเข้าจับกับส่วนอะไกลโคนของดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น ค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q (0.94 mM) ต่อดัลโคซินินกลูโคไซด์ต่ำกว่า H18 1.6 เท่า เนื่องจากการแทนที่แอสปารากีนด้วยกลูตามีนซึ่งต่างก็เป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว แต่กลูตามีนมีแขนงข้างที่ยาวกว่าจึงน่าจะเข้าถึงดัลโคซินินกลูโคไซด์ได้ดีกว่า ส่วนค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F มีค่าใกล้เคียงกับ H18 ซึ่งให้เห็นว่าการแทนที่ฮิสติดีนด้วยฟีนิลอะลานีนซึ่งเป็นการเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกให้แก่บริเวณจับอะไกลโคน ไม่มีผลต่อความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับดัลโคซินินกลูโคไซด์ แสดงว่าตำแหน่ง H253 ไม่น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการจับกับดัลโคซินินกลูโคไซด์

เมื่อพิจารณาค่า k_{cat} สำหรับการสลายตัวของโคชินินกลูโคไซด์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ H18 แล้ว พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีค่า k_{cat} ต่ำลง โดยที่เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V (4.27 s^{-1}) มีค่า k_{cat} ลดลง 8 เท่า เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F (7.22 s^{-1}) มีค่า k_{cat} ลดลง 5 เท่า เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q (2.82 s^{-1}) มีค่า k_{cat} ลดลง 12 เท่า และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y (3.29 s^{-1}) มีค่า k_{cat} ลดลง 10 เท่า แสดงว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของโคชินินกลูโคไซด์ลดลง โดยการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ N323 และ K402 ได้รับผลกระทบค่อนข้างมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง N323 และ K402 น่าจะมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของโคชินินกลูโคไซด์ และเมื่อเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดเปรียบเทียบกับ H18 พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F และเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q มีค่า k_{cat}/K_m ลดลงค่อนข้างมากคือ ลดลงประมาณ 7 เท่า และ 11 เท่า ตามลำดับ แสดงว่าประสิทธิภาพการสลายตัวของโคชินินกลูโคไซด์ของ H253F และ N323Q ลดลงค่อนข้างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V และ K402Y ที่มีค่า k_{cat}/K_m ลดลงเพียง 3 เท่า ที่เป็นเช่นนี้เพราะค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F และเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อโคชินินกลูโคไซด์ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V และเอนไซม์กลายพันธุ์ K402 Y จึงทำให้ค่า k_{cat}/K_m ต่ำ

สำหรับค่า K_m , k_{cat} และ k_{cat}/K_m ของลินามารีสต่อลินามารินที่หาได้มีค่า 2.28 mM, 40.91 s^{-1} และ $17.94 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ คือ 1.05 mM, 0.026 s^{-1} และ $0.025 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ตามลำดับ (Keresztessy *et al.*, 2001) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ใช้ต่างกัน ส่วนค่า K_m , k_{cat} และ k_{cat}/K_m ของเอนไซม์ H18 คัดโคชินินธรรมชาติ และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดต่อลินามารินไม่สามารถหาได้ เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ย่อยสลายลินามารินได้น้อย อาจเนื่องมาจากลินามารินมีหมู่แทนที่ 3 หมู่ ที่ต่อกับคาร์บอนอะตอมที่สร้างพันธะเบต้า-กลูโคซิดกับน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะไปขัดขวางการเข้าจับกับส่วนจับอะไกลโคนของเอนไซม์เหล่านี้ จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายลินามารินได้ ส่วนการที่ลินามารีสไม่สามารถย่อยสลายโคชินินกลูโคไซด์ได้ อาจเนื่องมาจากส่วนอะไกลโคนของโคชินินกลูโคไซด์มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะเข้าจับกับส่วนจับอะไกลโคนของลินามารีสได้

เพื่อให้เกิดความแม่นยำของผลการทดลองผู้ทดลองจึงเลือกใช้ค่าทางจลนพลศาสตร์จากกราฟ Michaelis-Menten ที่มีค่า R^2 (non-linear regression) มากกว่า 0.99 ขึ้นไป และสับเซตของโคชินินกลูโคไซด์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความบริสุทธิ์น้อย จึงส่งผลต่อค่า K_m , k_{cat} และ k_{cat}/K_m

ต่อการสลายตัลโคซินินกลูโคไซด์คลาดเคลื่อนไป นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ยังส่งผลต่อค่าทางจลนพลศาสตร์อีกด้วย

6. การศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (trasglucosylation)

การศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสทำโดยนำเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งหมดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ (methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol และ *tert*-butanol) เข้มข้น 0.9 M และ 10 mM *p*NP-Glc และปรับปริมาตรให้ได้ 100 μ l ด้วย 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เหตุผลที่เลือกใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 0.9 M เพราะมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่าที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงๆ ความสามารถในการละลายของ *n*-butanol, *iso*-butanol และ *sec*-butanol จะลดลง (เพ็ญพร, 2549) และเหตุที่เลือกใช้เวลาในการบ่ม 20 ชั่วโมง เนื่องมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าปริมาณ alkyl glucoside ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และจะลดลงพร้อมๆ กับการเพิ่มขึ้นของกลูโคสหลังผ่าน 24 ชั่วโมงไปแล้ว ทั้งนี้เนื่องจากการสลาย alkyl glucoside เมื่อความเข้มข้นของ alkyl glycoside สูงขึ้น (Svasti *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 20 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองจะแสดงในรูปของ %alkyl glucoside ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (Svasti *et al.*, 2003) ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 15 และภาพ TLC แสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 15 ปริมาณ %alkyl glucoside ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

เอนไซม์	Primary alcohol				Secondary alcohol		Tertiary alcohol	
	MeOH	EtOH	<i>n</i> -prop	<i>n</i> -but	<i>iso</i> -but	<i>iso</i> -prop	<i>sec</i> -but	<i>tert</i> -but
M195V	24.05	46.08	68.02	90.00	71.36	3.26	9.67	0.00
H253F	29.25	44.04	65.90	87.36	75.10	6.29	10.26	0.00
N323Q	29.05	42.53	69.31	88.27	74.30	5.90	12.15	0.00
K402Y	24.91	40.14	64.93	89.37	74.15	5.58	13.44	0.00
H18	22.41	42.14	67.58	79.43	70.52	3.89	11.90	0.00
คัลโคซิเนส	24.47	38.30	66.41	83.38	68.58	4.37	12.31	0.00
ลินามารส	51.86	51.33	72.65	71.17	73.56	60.11	65.15	34.84

MeOH = methanol, EtOH = ethanol, *n*-prop = *n*-propanol, *n*-but = *n*-butanol,

iso-but = *iso*-butanol, *iso*-prop = *iso*-propanol, *sec*-but = *sec*-butanol, *tert*-but = *tert*-butanol

จากตารางที่ 15 พบว่า %alkyl glucoside ที่เกิดขึ้น โดยใช้แอลกอฮอล์ต่างๆเป็นตัวรับน้ำตาลของ H18 และคัลโคซิเนสธรรมชาติมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้ายหมู่น้ำตาลจะใช้ค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ในการเปรียบเทียบ ซึ่งจะพบว่า H18 และคัลโคซิเนสสามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี และใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้บ้าง แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) และลินามารสสามารถเร่งการย้ายหมู่น้ำตาลไปให้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิ ได้ดีทั้ง 3 ตัว เหตุที่ลินามารสสามารถย้ายหมู่น้ำตาลไปให้แอลกอฮอล์ตติยภูมิได้ ในขณะที่คัลโคซิเนสไม่สามารถย้ายได้ เนื่องมาจากโครงสร้างลินามารินซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของลินามารส มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ตรงคาร์บอนที่ต่อกับพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ซึ่งทำให้ตำแหน่งจับอะไกลโคนสามารถรองรับโครงสร้างคาร์บอนที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ที่ต่อกับพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก เช่นในโครงสร้าง *tert*-butyl glucoside (Svasti *et.al.*, 2003)

เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิด กับ H18 และคัลโคซิเนสธรรมชาติ โดยดูจากเปอร์เซ็นต์ของ alkyl glucoside ที่เกิดขึ้น พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V สามารถย้ายหมู่น้ำตาลไปให้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิชนิด *n*-butanol ได้ดี เนื่องจากการเปลี่ยนเมไธโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างยาวและมีขั้ว เป็นเวอรีนที่มีแขนงข้างสั้นและไม่มีขั้ว

เป็นการลดความเกะกะของแขนงข้าง (steric hindrance) และเป็นการเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิก ให้แก่บริเวณจับอะไกลโคโคน จึงสามารถจับกับ *n*-butanol ได้ดีขึ้น และไม่ไปขัดขวาง *n*-butanol ที่เข้ามาจับน้ำตาล ดังนั้นจึงเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้ดีกว่าดัล โคซิเนสธรรมชาติ

เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F และเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q มีความคล้ายคลึงกัน คือสามารถย้ายหมู่ น้ำตาลจาก *p*NP-Glc ไปให้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ คือ methanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ คือ *iso*-propanol ได้ดีกว่า H18 และดัล โคซิเนสธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องมาจากการแทนที่ฮิสติดีนด้วยฟีนอลอะลานีน เป็นการช่วยเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกให้แก่บริเวณจับอะไกลโคโคน ส่งผลให้ H253F สามารถจับกับแอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ และทุติยภูมิบางชนิดได้ดีขึ้น และการแทนที่แอสปารากีนด้วยกลูตามีนซึ่งทั้งคู่มีประจุเหมือนกัน แต่กลูตามีนมีแขนงข้างที่ยาวกว่า จึงน่าจะเข้าถึงแอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ และทุติยภูมิบางตัวได้ดีขึ้น นอกจากการพิจารณาหมู่เอมิโนที่เปลี่ยนไปแล้ว เรายังต้องพิจารณาดำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์ในบริเวณจับอะไกลโคโคนอีกด้วย ซึ่งจากการพิจารณาดำแหน่งกลายพันธุ์ H253F และ N323Q ในบริเวณจับอะไกลโคโคนของแบบจำลองของดัล โคซิเนสแล้ว พบว่าทั้งสองตำแหน่งอยู่ในบริเวณที่ใกล้กัน ดังนั้นผลการกลายพันธุ์ของทั้งสองตำแหน่งนี้จึงมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน คือ มีความสามารถในการย้ายหมู่ น้ำตาลไปให้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิได้ดีเพียงบางตัวเท่านั้น ทั้งๆที่จะเกิดได้ดีกับทุกตัว อาจเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ที่บริเวณนี้ไม่เหมาะที่จะจับกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิชนิด ethanol, *n*-propanol และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิชนิด *sec*-butanol

สำหรับเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y จะพบว่าสามารถย้ายหมู่ น้ำตาลจาก *p*NP-Glc ไปให้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิชนิด *n*-butanol และ *iso*-butanol และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิชนิด *iso*-propanol ได้ดีกว่า H18 และดัล โคซิเนสธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องมาจากการแทนที่ไลซีนด้วยไทโรซีน ซึ่งมีแขนงข้างที่สั้นลง และมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหลืออยู่ จึงไม่ไปขัดขวางการเข้าจับกันระหว่างเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y กับแอลกอฮอล์ และมีส่วนช่วยในการจับกับแอลกอฮอล์ ทำให้เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y สามารถจับกับแอลกอฮอล์ได้ดีขึ้น แต่เมื่อพิจารณาดำแหน่งกลายพันธุ์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y จากโครงสร้างของดัล โคซิเนสธรรมชาติแล้ว พบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ K402Y อยู่ไกลออกไปจากบริเวณจับอะไกลโคโคน ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้จึงน่าจะมีผลกับเฉพาะแอลกอฮอล์ชนิดที่มีสายยาวเท่านั้น

สำหรับแอลกอฮอล์ดีบุก พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดยังคงไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ดีบุกเป็นตัวรับน้ำตาลได้เหมือนกับ H18 และดัลโคซิเนส อาจเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้โครงสร้างของบริเวณจับอะไกลโคนเปลี่ยนแปลงจนสามารถรองรับโครงสร้างแอลกอฮอล์ดีบุก ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับกลูโคส ที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ที่คาร์บอนอะตอมที่ต่อกับพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้ปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสเกิดได้ดีกับแอลกอฮอล์ทุกตัว ดังนั้นจึงควรทำการกลายพันธุ์มากกว่าหนึ่งตำแหน่งเพื่อให้ได้เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่สามารถใช้แอลกอฮอล์สายยาวเป็นตัวรับน้ำตาลได้ ในการทดลองนี้เลือกใช้ผลการทดลองที่มีค่า R^2 (linear regression) ของสารมาตรฐานมากกว่า 0.9 ขึ้นไป เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นจากการทดลอง

สรุปและข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้ได้ทำการหาตำแหน่งกรดอะมิโนในที่คาดว่าจะมีความสำคัญต่อการจับกับสับสเตรทในบริเวณจับอะไกลโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนส โดยการแทนที่กรดอะมิโนของคัลโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนของลีนามารสในตำแหน่งที่สอดคล้องกัน ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้เป็นตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนระหว่างคัลโคซิเนส และลีนามารส และมีแขนงข้างยื่นเข้าไปในช่องจับอะไกลโคน จึงได้เลือกทำการกลายพันธุ์ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ได้แก่ M195V H253F N323Q และ K402Y โดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งคาดว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ได้จะมีความสามารถในการจับกับสับสเตรท และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายคัลโคซิโนกลูโคไซด์ลดลง และมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาล้ำกับลีนามารสมากขึ้น ทั้งทางด้านความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายลีนามาริน และการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ถูกผลิตใน *P. pastoris* โดยใช้ 0.5% (v/v) methanol เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน และเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดจะถูกทำบริสุทธิ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลามิเดเจล พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดปรากฏแถบที่มีลักษณะเป็นป็นขนาดประมาณ 66 kDa ทั้งนี้เนื่องมาจากในยีสต์จะมีการเติมน้ำตาลบนโปรตีนมากกว่าในพืช และคิดว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ถูกทำบริสุทธิ์มีความบริสุทธิ์พอที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ในขั้นต่อไป จากการทำเวสเตอร์นอิมมูโนวิเคราะห์พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทุกตัวสามารถจับกับ mouse monoclonal antibody against natural dalcocchinase และสามารถถูกตรวจสอบได้โดย horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal antibody against mouse immunoglobulins ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดเป็นเอนไซม์คัลโคซิเนสจริง และจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดเปรียบเทียบกับคัลโคซิเนสธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (H18) ต่อสับสเตรท 4 MU-Glc โดยใช้เอนไซม์อย่างละ 0.3 U เท่ากันทุกตัว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แปรผันตามปริมาณโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue

การศึกษาการเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดจะใช้เอนไซม์ H18 ในการเปรียบเทียบ เนื่องจากเป็นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ถูกผลิต และผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V N323Q และ K402Y ต่อคัลโคซิโนกลูโคไซด์มีค่าลดลง แสดงว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับคัลโคซิโนกลูโคไซด์ได้ดีขึ้น ส่วนค่า K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อคัลโคซิโน

กลูโคไซด์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ H18 แสดงว่าความสามารถในการจับกับ คัลโคซินินกลูโคไซด์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F คล้ายกับ H18 จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า ตำแหน่ง M195 N323 และ K402 น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการจับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ ส่วนตำแหน่ง H253 ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับกับคัลโคซินินกลูโคไซด์ และค่า K_m ของเอนไซม์ กลายพันธุ์ทั้งหมดต่อ $pNP-Glc$ มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง M195 H253 N323 และ K402 มีความสำคัญต่อการจับกับ $pNP-Glc$ และจากค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งหมดต่อทั้ง คัลโคซินินกลูโคไซด์ และ $pNP-Glc$ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ H18 ชี้ให้เห็นว่า ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ลดลง แสดงว่าตำแหน่ง M195 H253 N323 และ K402 มีเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการสลาย คัลโคซินินกลูโคไซด์ และ $pNP-Glc$ และเอนไซม์คัลโคซินินสกลายพันธุ์ทุกชนิดยังคงไม่สามารถจับ และย่อยสลายลินามารินได้ แสดงว่าตำแหน่งที่ทำกลายพันธุ์อาจเป็นตำแหน่งที่ไม่ เกี่ยวข้องกับการจับกับลินามารินในเอนไซม์ลินามาริน และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเดียวอาจไม่ เพียงพอที่จะทำให้เอนไซม์กลายพันธุ์สามารถจับ และเร่งปฏิกิริยาการสลายลินามารินได้

จากการศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V สามารถใช้ แอลกอฮอล์ปฐมภูมิชนิด *n*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F และเอนไซม์ กลายพันธุ์ N323Q สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิชนิด methanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol เป็น ตัวรับน้ำตาลได้ดีได้ดี ส่วนแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถใช้ *iso*-propanol ได้ดี สำหรับเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิชนิด *n*-butanol และ *iso*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี และใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ *iso*-propanol เป็น ตัวรับน้ำตาลได้ดี แต่เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดยังไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิตัวรับน้ำตาล ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ที่ว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัว ยังไม่สามารถ เร่งปฏิกิริยาการสลายลินามารินซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า บริเวณจับอะไกลโคโคนยังคงไม่สามารถรองรับโครงสร้างคาร์บอนที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ที่ต่อกับ พันธะเบต้า-กลูโคซิดิกได้

จากการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าทุกตำแหน่งที่เลือกมาทำการกลายพันธุ์ในการทดลองนี้มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสับเสตรท และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส ซึ่งจะสังเกตได้จากค่าทางจลนพลศาสตร์ และการใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิบางตัวเป็นตัวรับน้ำตาลที่ เปลี่ยนไป แต่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้เอนไซม์คัลโคซินินสกลายพันธุ์ ทั้งหมดสามารถจับ และสลายลินามารินได้ และสามารถใช้อัลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาล

ได้ ดังนั้นจึงควรทำการกลายพันธุ์ที่หลายๆตำแหน่งพร้อมๆกัน เช่น ทำการกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตำแหน่งพร้อมกัน ซึ่งคิดว่าน่าจะทำให้เอนไซม์กลายพันธุ์สามารถจับ และเร่งปฏิกิริยาการสลายลินามารินได้ และสามารถใช้อัลกอฮอล์ปฐมภูมิ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และแอลกอฮอล์ตติยภูมิทุกชนิดเป็นตัวรับน้ำตาลได้ดีขึ้น และอาจใช้ผลจากการทำ molecular docking มาอธิบายผลการทดลองเพิ่มเติม เช่น การอธิบายผลของกรดอะมิโนต่อความสัมพันธ์ในการจับกับสับสเตรททั้ง คัลโคจีนินกลูโคไซด์ *p*NP-Glc และลินามารินรวมถึงแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆที่เข้ามารับน้ำตาล อัลคิลกลูโคไซด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสด้วย และการพิจารณาค่าพลังงานในการจับกับสับสเตรทคัลโคจีนินกลูโคไซด์ และ *p*NP-Glc เพื่ออธิบายความสามารถในการจับกับสับสเตรทเหล่านี้ของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้การศึกษากลไกการย้ายหมู่น้ำตาลอาจใช้สารประกอบ 2-deoxy-2-fluoroglycoside ซึ่งมีโครงสร้างเลียนแบบน้ำตาล โดยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (inactivation) โดยจะไปเกิดพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ได้เป็น glycosyl-enzyme intermediate และใช้อัลกอฮอล์ชนิดต่างๆเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์กลับมาทำงานเหมือนเดิมได้ (reactivation) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น alkyl-2-deoxy-2-fluoroglycoside และวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Hommalai *et al.*, 2005) เป็นต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เพ็ญพร สุจิตต์นารัตน์. 2549. การผลิตและการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของรีคอมบิแนนท์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Barrett, T., G. C. Suresh, S. Tolly, E. Dodson and M. Hughes. 1995. The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. **Structure**. 3: 951-960.
- Cairns, J.R., V. Champattanachai, C. Srisomsap, B.W. Liebold, B. Thiede and J. Svasti. 2000. Sequence and expression of thai rosewood β -glucosidase/ β -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. **J. Biochem.** 128: 999-1003.
- Cereghino, L. J. and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 45-66.
- Cicek, M. and A. Esen. 1999. Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) β -glucosidase in *E. coli*. **Biotechnol. Bioeng.** 63: 392-400.
- Eksittikul, T., M. Chulavatnatol. 1988. Characterization of cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*manihot esculenta* Crantz). **Arch. Biochem. Biophys.** 266 (1): 263-269.
- Esen, A. 1993. β -glucosidase: overview, pp. 1-14. In A. Esen, ed. β -Glucosidase Biochemistry and Molecular Biology. **American Chemical Society**, Washington D.C.
- Hewitt M. C. and P. H. Seeberger. 2001. Solution and solid-support synthesis of a potential leishmaniasis carbohydrate vaccine. **J. Org. Chem.** 66: 4233-4243.

- Hommalai, G., P. Chaiyen and J. Svasti. 2005. Studies on transglucosylation reactions of cassava and thai rosewood β -glucosidases using 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates. **Arch. Biochem. Biophys.** 442 : 11-20.
- Hughes, M. A. 1993. Molecular genetic of plant cyanogenic β -glucosidases, pp. 153-169. In A. Esen, ed. β -glucosidases Biochemistry and Molecular Biology. **America Chemical Society**, Washington, D.C.
- Hughes, M.A, K. Brown, A. Pancoro, B.S. Murray, E. Oxtoby and J. Hughes. 1992. A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz). **Arch. Biochem. Biophys.** 295 (2): 273-279.
- Invitrogen. n.d. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia Pastoris*. EasySelectTM *Pichia* Expression Kit. Available Source: <http://www.invitrogen.com>, March 29, 2002.
- Keresztessy, Z., K. Brown, M.A. Dunn and M.A. Hughes. 2001. Identification of essential active-site residues in cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. **Biochem. J.** 353: 199-205.
- Keresztessy, Z., L. Kiss and M. A. Hughes. 1994. Investigation of the active site of the cyanogenic β -D-glucosidase (linamarase) from *Manihot esculenta* Crantz (cassava). II. Identification of Glu-198 is an active site carboxylate group with acid catalytic function. **Arch. Biochem. Biophys.** 315: 323-330.
- Lirdprapamongkol, K. and J. Svasti. 2000. Alkyl glucoside synthesis using Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnology Letters** 22: 1889-1894.

- Mizutani, M., H. Nakanishi, J. Ema, S.J. Ma, E. Noguchi, M.I. Ochiai, M.F. Mizutani, M. Nakao and K. Sakata. 2002. Cloning of β -Primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. **Plant Physiol.** 130(4): 2164-2176.
- Nahrstedt, A and E. Mueller. 1993. Molecular genetic of plant cyanogenic β -glucosidases, pp. 134. In A. Esen, ed. β -Glucosidase (linamarase) of larvae of the moth *Zygaena trifolii* and its inhibition by some alkaline earth metal ions. **America Chemical Society**, Washington, D.C.
- Opassiri, R., J.K. airns, T. Akiyama, O.W. Awapati, J. Svasti and A. Esen. 2003. Characterisation of a rice β -Glucosidase highly express in flower and germinating shoot. **Plant Science** 165: 627-638.
- Palcic, M.M. 1999. Biocatalytic synthesis of oligosaccharide. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 616-624.
- Pyo, Y., T. Lee and Y. Lee. 2005. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Res. Int.** 38: 551-559.
- Sarney D.B. and E. N. Vulfson. 1995. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. **Trends Biotechnol.** 13: 164-172.
- Srisomsap, C., P. Subhasitanont, S. Techasakul, R. Surarit and J. Svasti. 1999. Synthesis of homo-and hetero-oligosaccharides by Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnology Letters** 21: 947-951.
- Srisomsap, C., J. Svasti, R. Surarit, V. Champattanachai, K. Boonpuan, P. Sawangareetrakul, P. Subhasitanont and D. Chokchaichamnankit. 1996. Isolation and characterization of an enzyme with β -D-glucosidase/ β -D-fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. **J. Biochem.** 119: 585-590.

- Surarit, R., J. Svasti, C. Srisomsap, W. Suginta, S. Khunysyeug, S. Nilwarangkoon, P. Harnsakul and E. Benjavongkulchai. 1995. Screening of glycohydrolase enzymes in Thai plant seeds for potential use in oligosaccharide synthesis. **J. Sci. Soc. Thailand.** 21: 293-303.
- Svasti, J., T. Phongsak and R. Sarnthima. 2003. Transglucosylation of tertiary alcohols using cassava β -glucosidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 305: 470-475.
- Svasti, J., C. Srisomsap, S. Techasakul and R. Surarit. 1999. Dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside and its β -Glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*. **Phytochemistry** 50: 739-743.
- Toonkool, P., P. Metheenukul, P. Sujiwattananarat, P. Paiboon, N. Tongtubtim, M. Ketudat-Cairns, J. Ketudat-Cairns and J. Svasti. 2006. Expression and purification of dalcochinase, a β -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacteria hosts. **Protein Expres. Purif.** 48: 195-204.
- Vetter, J. 1999. Plant cyanogenic glycoside. **Toxicon** 38: 1-35.
- Zechel D. L. and S. G. Withers. 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. **Acc. Chem. Res.** 33: 11-18.

ภาคผนวก

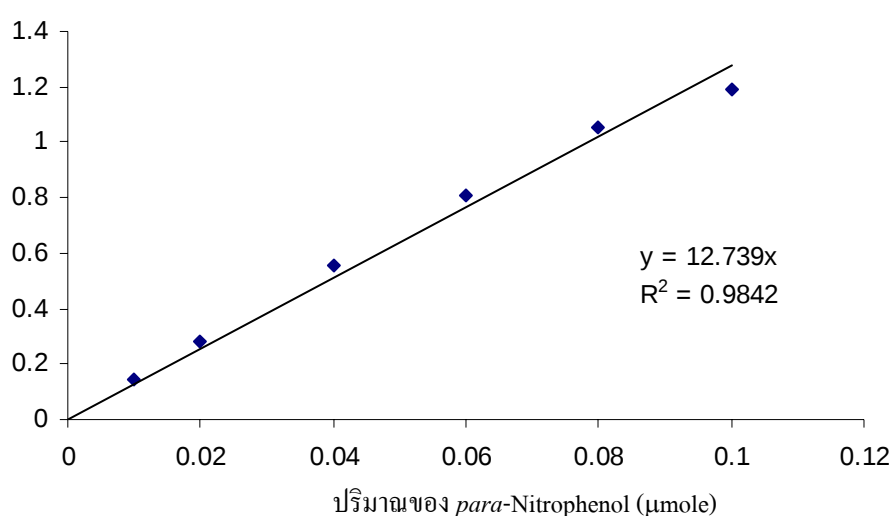
ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานและกราฟปริมาณเอนไซม์

1. กราฟมาตรฐาน *p*NP ที่ใช้ในการหากิจกรรมเอนไซม์ใน culture media และในการทำปฏิกิริยา

เตรียมสารละลาย *p*NP มาตรฐานปริมาณ 0-0.1 micromole ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้ได้ปริมาตร 500 μ l แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm วาดกราฟระหว่างปริมาณ *p*NP กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm

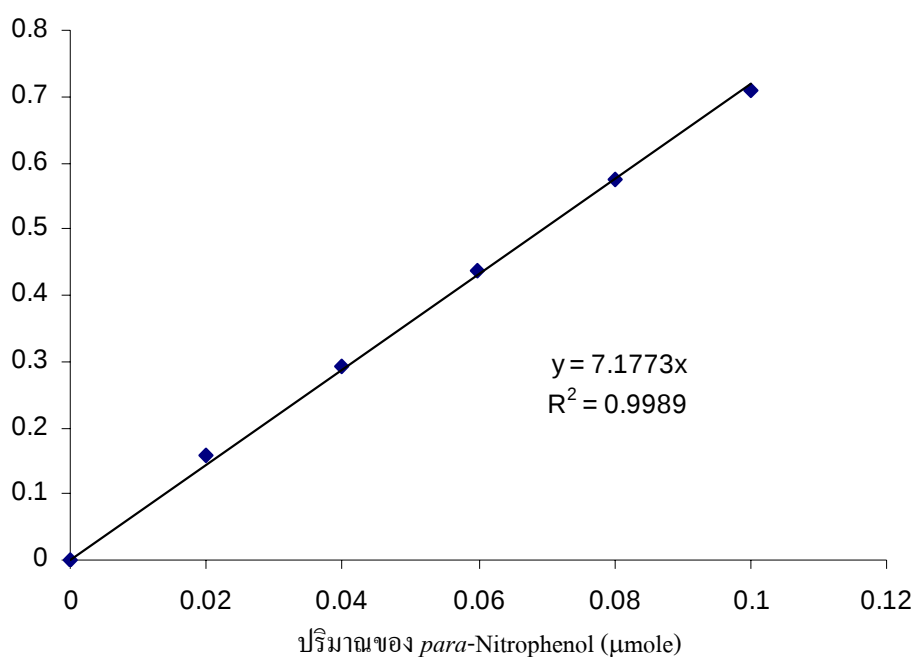


ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐาน *p*NP ที่ใช้ในการหากิจกรรมเอนไซม์ใน culture media และในการทำปฏิกิริยา

2. กราฟมาตรฐาน pNP ที่ใช้สำหรับหาปริมาณเอนไซม์การศึกษาทางด้านจลนพลศาสตร์และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

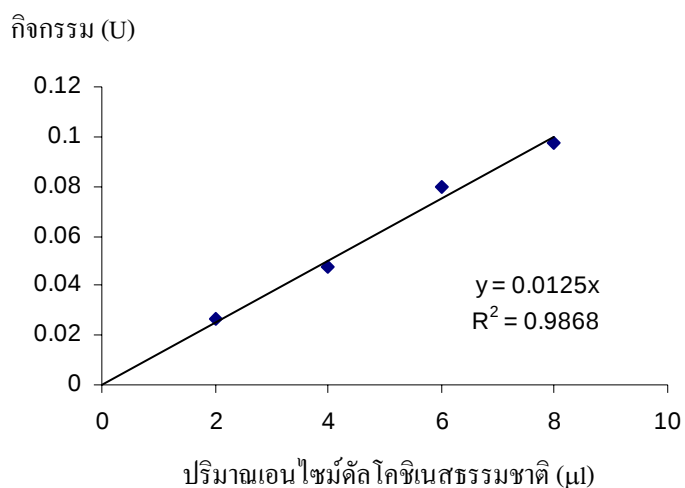
เตรียมสารละลาย pNP มาตรฐานความเข้มข้น 0-0.1 micromole ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้ได้ปริมาตร 100 μ l แล้วเติม 2 M sodium carbonate ปริมาตร 1 ml และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm วาดกราฟระหว่างปริมาณ pNP กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm



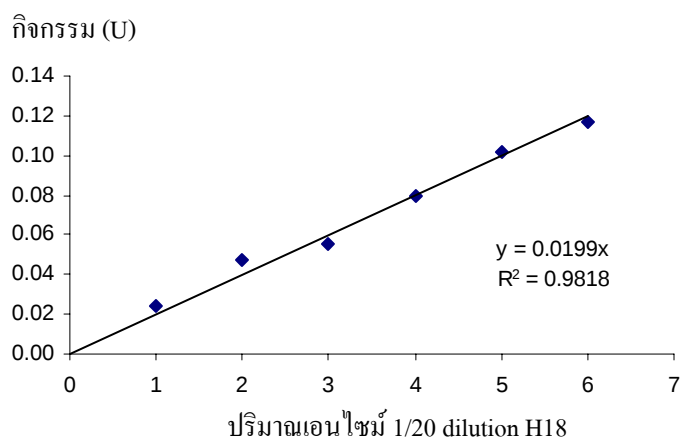
ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐาน pNP ที่ใช้สำหรับหาปริมาณเอนไซม์การศึกษาทางด้านจลนพลศาสตร์และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

3. กราฟปริมาณเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์



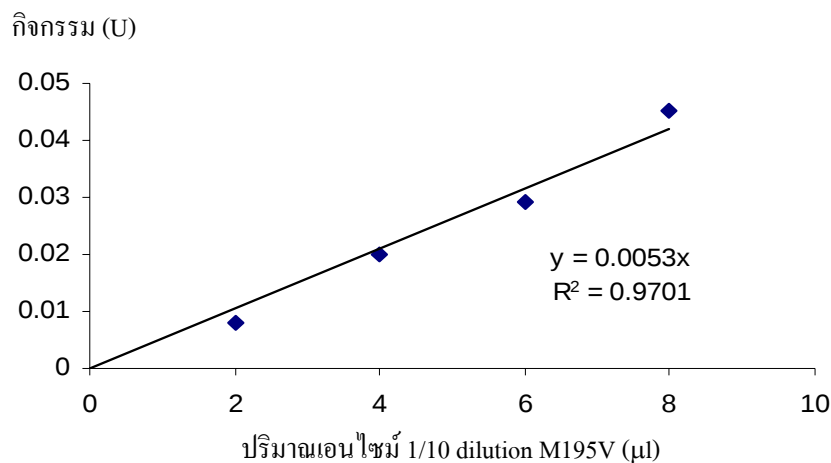
ภาพผนวกที่ ก3 กราฟปริมาณเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

4. กราฟปริมาณเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (H18) ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์



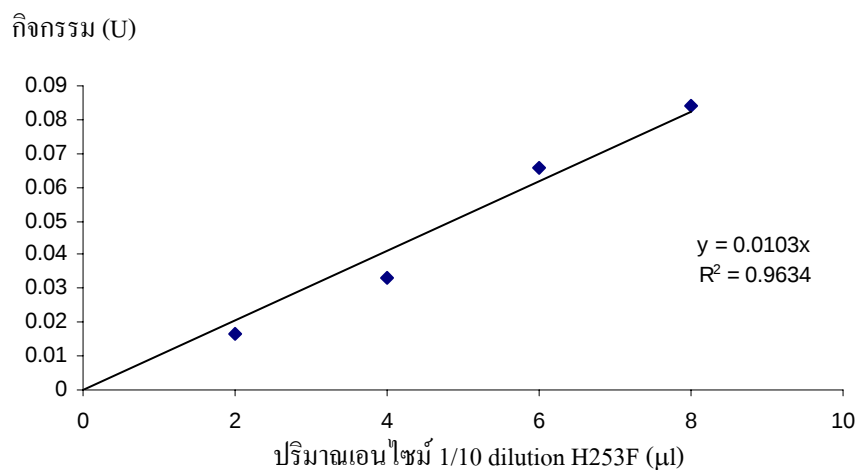
ภาพผนวกที่ ก4 กราฟปริมาณเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

5. กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์



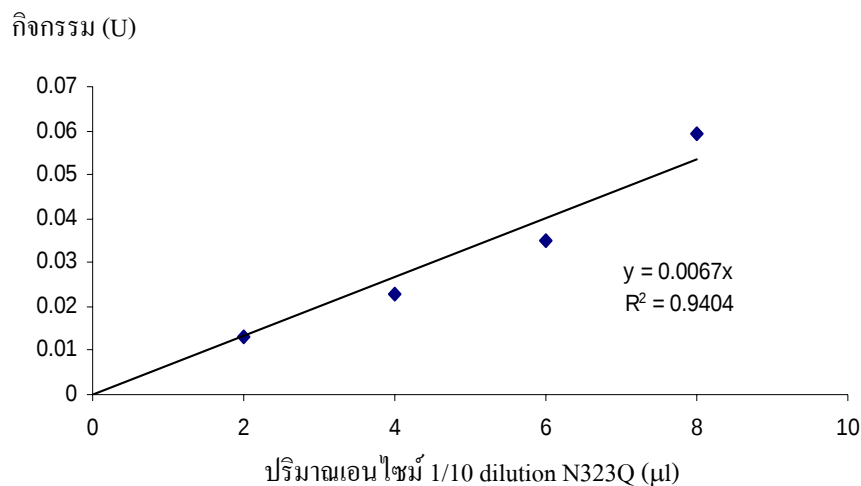
ภาพผนวกที่ ก5 กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

6. กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ H235F ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์



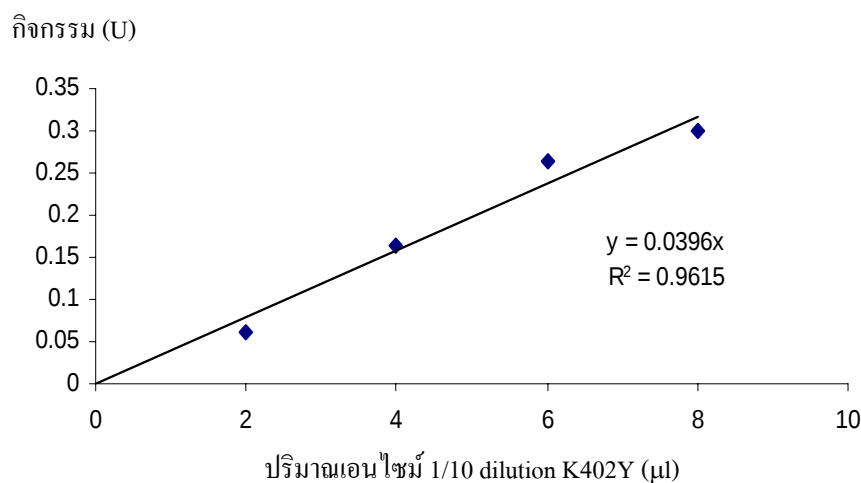
ภาพผนวกที่ ก6 กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ H235F ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

7. กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์



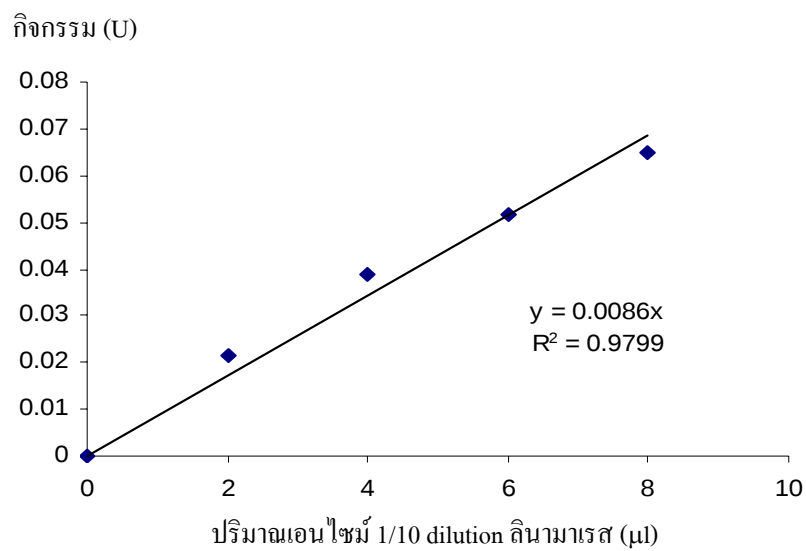
ภาพผนวกที่ ก7 กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

8. กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์



ภาพผนวกที่ ก8 กราฟปริมาณเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

9. กราฟปริมาณเอนไซม์ลินามารินที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

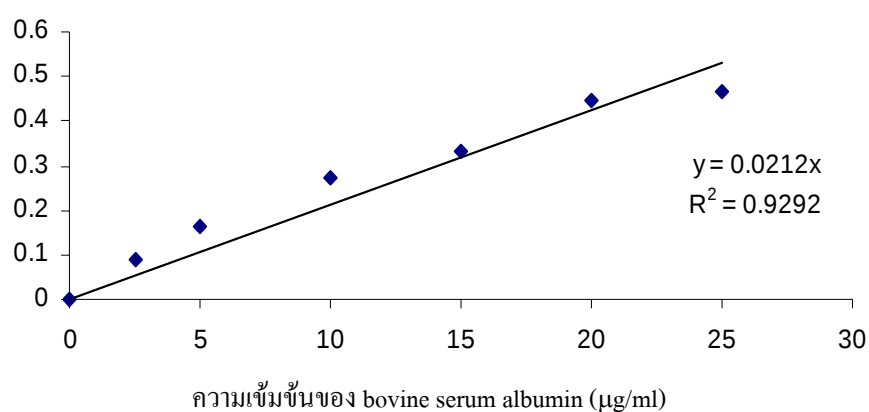


ภาพผนวกที่ ก9 กราฟปริมาณเอนไซม์ลินามารีสที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-Glc กับกิจกรรมเอนไซม์

10. กราฟมาตรฐานโปรตีน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้น 0-25 $\mu\text{g/ml}$ โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 μl และเติม Coomassie Plus Reagent ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

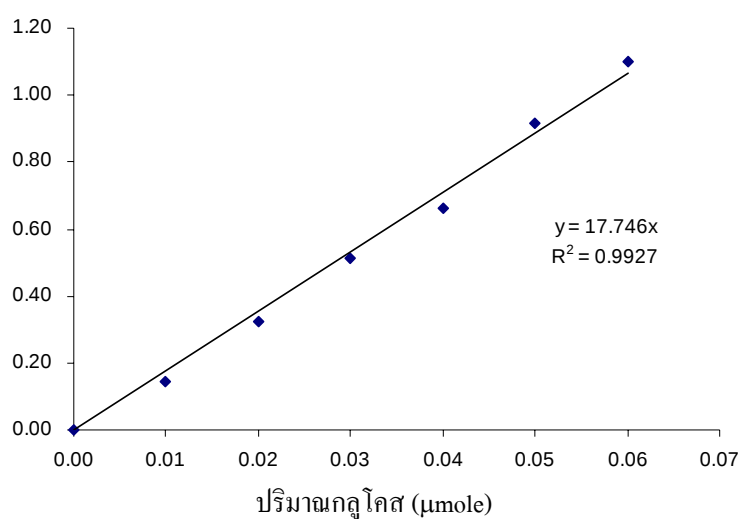


ภาพผนวกที่ ก10 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0-25 $\mu\text{g/ml}$

11. กราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีปริมาณ 0-0.06 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl เติม 2 mg/ml ABTS ปริมาตร 50 μl และ glucose oxidase kit (5 unit/ml) ปริมาตร 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm



ภาพผนวกที่ ก11 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของยีนคัล โคซินสกลายพันธุ์ M195V

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคชินสกลายพันธุ์ M195V โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF1

```

GTTTTTTTATCGACTTTTTTAACGACAANNCTTGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTGAAACGATGAGATTT
CCTTCCATTTTTACTGCTGTTTTATTGCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG
AAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCC
ATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGG
GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCATGCTGCAGTTCCTCCATTCA
ACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGT
ACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTT
GACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCT
CCTGGCCTAGAATTCTCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCT
CATCAATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTTCATTGGGATCTTCACAAGCCTTGAG
GATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCAATTATT
TGGAGATAGGGTAAAGCAT

```

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็ของดัดโคชินสกลายพันธุ์ M195V

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของดัดโคชินสกลายพันธุ์ M195V

```

Query:892  ttttaacgacaa- -cttgagaagatcaaaaaacaactaattattcgaaacgatgagattt 949
          |||
Sbjct:17   ttttaacgacaanncttgagaagatcaaaaaacaactaattattcgaaacgatgagattt 76

Query:950  ccttcaatttttactgctgtttttattcgagcatcctccgcattagctgctccagtcaac 1009
          ||||
Sbjct:77   ccttccatttttactgctgtttttattcgagcatcctccgcattagctgctccagtcaac 136

Query:1010 actacaacagaagatgaaacgggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagat 1069
          |||
Sbjct:137  actacaacagaagatgaaacgggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagat 196

Query:1070 ttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggtta 1129
          |||
Sbjct:197  ttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggtta 256

Query:1130 ttgtttataaataactactatttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgag 1189
          |||
Sbjct:257  ttgtttataaataactactatttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgag 316

Query:1190 aaaagagagggtgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctcca 1249
          |||
Sbjct:317  aaaagagagggtgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctcca 376

Query:1250 ttcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtaggag 1309
          |||
Sbjct:377  ttcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtaggag 436

Query:1310 tatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaa 1369
          |||
Sbjct:437  tatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatccagaa 496

Query:1370 aagatagcggatagaagcaacgggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaag 1429
          |||
Sbjct:497  aagatagcggatagaagcaacgggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaag 556

Query:1430 gatattgcaatcatgaaggatatagaacttgagtgcttatagaatgtccatctcctggcct 1489
          |||
Sbjct:557  gatattgcaatcatgaaggatatagaacttgagtgcttatagaatgtccatctcctggcct 616

```

```

Query:1490 agaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccacaggagttgactactac 1549
          |||
Sbjct:617 agaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccacaggagttgactactac 676

Query:1550 aacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaaccatttttcat 1609
          |||
Sbjct:677 aacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaaccatttttcat 736

Query:1610 tgggatcttccacaagccttggaggatgagtacggtggcttcttaaatacatagcgttgta 1669
          |||
Sbjct:737 tgggatcttccacaagccttggaggatgagtacggtggcttcttaaatacatagcgttgta 796

Query:1670 aatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttggagatagggtaaagcat 1729
          |||
Sbjct:797 aatgatttccaagactatgcggatctttgctt-caattatttggagatagggtaaagcat 855

```

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

```

GGAAATTTTGGGAGCATCCTCCTCGTACAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATANTGGGATAACTTCAC
CCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAG
GATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCTCCCAACGG
GTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAATGG
CATAACACCATTGTAAACATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAAT
CATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGA
TTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCGAATGGGTATGCATACGGTGTTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCC
ATCGTACAATCCAACCTTGACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTG6TTGCGCACAACTGATCCTTCT
CATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACG
TAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGG
ATG6TTTATGGACCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAG
TTTACTACAGATCAA

```

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็ของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ M195V

```

Query:1291 agcatcctcctcgtagcaggtatgaaggtgagggcagagtaccaagtata-tgggataact 1349
          |||
Sbjct:14 agcatcctcctcgtagcaggtatgaaggtgagggcagagtaccaagtataantgggataact 72

Query:1350 tcaccacccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgacc 1409
          |||
Sbjct:73 tcaccacccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgacc 132

Query:1410 aatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatataaacttggatgcttata 1469
          |||
Sbjct:133 aatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatataaacttggatgcttata 192

Query:1470 gaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaacc 1529
          |||
Sbjct:193 gaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaacc 252

Query:1530 aaacaggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacac 1589
          |||
Sbjct:253 aaacaggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacac 312

Query:1590 catattgaaccatttttcatgggatcttccacaagccttggaggatgagtacggtggct 1649
          |||
Sbjct:313 catattgaaccatttttcatgggatcttccacaagccttggaggatgagtacggtggct 372

```

Query:1650 tcttaaatacatagcgttgtaaatagatttccaagactatgcggatctttgcttccaattat 1709
 |||
 Sbjct:373 tcttaaatacatagcgttgtaaatagatttccaagactatgcggatctttgcttccaattat 432

Query:1710 ttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatg 1769
 |||
 Sbjct:433 ttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatg 492

Query:1770 ggtatgcatacgggtgtttttgaccagggtcgatgttctccatcgtaaatccaacttgca 1829
 |||
 Sbjct:493 ggtatgcatacgggtgtttttgaccagggtcgatgttctccatcgtaaatccaacttgca 552

Query:1830 caggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatg 1889
 |||
 Sbjct:553 caggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatg 612

Query:1890 cagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaagggtacaataggca 1949
 |||
 Sbjct:613 cagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaagggtacaataggca 672

Query:1950 tttccttgacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgcta 2009
 |||
 Sbjct:673 tttccttgacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgcta 732

Query:2010 cccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggt 2069
 |||
 Sbjct:733 cccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggt 792

Query:2070 atccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaa 2128
 |||
 Sbjct:793 atccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaa 851

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซินเนสกลายพันธุ์ M195V โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

AATTTCTTTTTTTGGAGAAGGGTAAGCTTGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCAATGGGTATGCA
 TACCGGTGTTTTTGCACAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAG
 ACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGACAAAAGGAAGTATCAGGAAC
 ATCAGAAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACGATGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAA
 TGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGC
 ATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATAGTTAAGGGTTTCATTTGATT
 TTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCT
 CACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATG
 TGCATTTATCCAAAAGGACTTCAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCA
 CTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGA
 TAGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTTCGATATGCAATTAAGTCTTGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCCTG
 GTCATTGTTGGACAACCTTTTGAATGGGCTGAGGGTTATACATCCCGATTGATTATATTTTGTGAACCTACACCAC
 TTTTAATAGATATCCCCAGCTCCT

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคัลโคซินเนสกลายพันธุ์ M195V

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคซินเนสกลายพันธุ์ M195V

Query:1729 ttggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacgggtgttt 1788
 |||
 Sbjct:28 ttggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacgggtgttt 87

Query:1789 tgcaccagggtcgatgttctccatcgtacaatccaacttgacagggtggggatgcaggaac 1848
 ||
 Sbjct:88 tgcaccagggtcgatgttctccatcgtacaatccaacttgacagggtggggatgcaggaac 147

 Query:1849 agagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgcagcaactgtccaagtgt 1908
 ||
 Sbjct:148 agagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgcagcaactgtccaagtgt 207

 Query:1909 caaaaggaagtatcaggaacatcagaaagggtacaataggcatttccttgacgtagtttg 1968
 ||
 Sbjct:208 caaaaggaagtatcaggaacatcagaaagggtacaataggcatttccttgacgtagtttg 267

 Query:1969 gggtataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctaccagcgatatcttgactt 2028
 ||
 Sbjct:268 gggtataccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctaccagcgatatcttgactt 327

 Query:2029 cacatgtggatggtttatggaccacttacagcaggaagggtatccagatagcatgcaata 2088
 ||
 Sbjct:328 cacatgtggatggtttatggaccacttacagcaggaagggtatccagatagcatgcaata 387

 Query:2089 tctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagttaaggggttc 2148
 ||
 Sbjct:388 tctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagttaaggggttc 447

 Query:2149 atttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacagatgcgtc 2208
 ||
 Sbjct:448 atttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacagatgcgtc 507

 Query:2209 aacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaa 2268
 ||
 Sbjct:508 aacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagcaacgcaa 567

 Query:2269 tggggctctttataggtccagtgcactccctcaggatggatgtgcatttatccaaaaggact 2328
 ||
 Sbjct:568 tggggctctttataggtccagtgcactccctcaggatggatgtgcatttatccaaaaggact 627

 Query:2329 tcgagatttggttgctttacttcaagggaaaagtataacaatcctttggtttacatcactga 2388
 || ||||| ||
 Sbjct:628 tcgagatttggttgctttacttcaagggaaaagtataacaatcctttggtttacatcactga 687

 Query:2389 aaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttgatagacac 2448
 ||
 Sbjct:688 aaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttgatagacac 747

 Query:2449 ttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgatatgcaattagggtc-tg 2507
 || ||
 Sbjct:748 ttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgatatgcaattaagtcctg 807

 Query:2508 gcgcaaatgtgaaaggattttttgcatgggtcattgttggacaac-tttgaatgggctgag 2566
 |||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||
 Sbjct:808 gcgcaaatgtgaaaggattttttgcctgggtcattgttggacaacttttgaatgggctgag 867

 Query:2567 gggtatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactttgaatagatatccc 2626
 ||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||||||
 Sbjct:868 gggtatacatcccgatttggattatattttgtgaactacaccacttttaatagatatccc 927

 Query:2627 aagctc 2632
 |||||
 Sbjct:928 cagctc 933

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ M195V โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

AGGATTATAGGCCAAATTAAGTTAAAGGGGTTCAATTTGATTTTATTGGGACTAAACTATTACACCACTAACTATGC
TACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGC
AATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGC
TTTACTTCAAGGAAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATC
ACTATCACTTGGAGAACTCTTTGATAGACACTTATAGAATTGATGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTCGATG
GCAATTAGGTCCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGATGGTCATTTGTTGGACAACCTTGAATGGGTCGAGGGTT
ATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAACTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTT
CAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAATTTTAGCACCAAGGCAAGATGGAGCTTATCA
ACGATGATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGA
ATTTCGCGGCCGCCCTGCAGTACGTAGAATTCACGTGGCCCAGCCGGCCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGGCG
GCCGCGAGCTTTCTAGACAAAAACTCATCTCAAAAGGATCTGAATAGCGCCGTCGAACATCCTCATCATC
ATTGAGTTTGIAGCCTT

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคลัสเตอร์โคชีในสกลายพันธุ์ M195V

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโคจีนสกลายพันธุ์ M195V

Query:2143 gggttcatttgattttattgg-actaaactattacaccactaactatgctaccaaatacag 2201
 |||
 Sbjct:28 gggttcatttgattttattgggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacag 87

Query:2202 atgcgtcaacatgctgccacctaagttaacctcacagatcctcaagtcactctcttacagc 2261
 |||
 Sbjct:88 atgcgtcaacatgctgccacctaagttaacctcacagatcctcaagtcactctcttacagc 147

Query:2262 aacgcaatggggctctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgcatttatccaa 2321
 |||
 Sbjct:148 aacgcaatggggctctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgcatttatccaa 207

Query:2322 aaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggtttaca 2381
|||||
Sbjct:208 aaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggtttaca 267

Query:2382 tcaactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcactttgaggaatccttga 2441
 |||
 Sbjct:268 tcaactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcactttgaggaatccttga 327

```
Query:2442 tagacacttatagaattgatagttattatcgtcatctcttttatgttcgatatgcaatta 2501
            |||
Sbjct:328 tagacacttatagaattgatagttattatcgtcatctcttttatgttcgatatgcaatta 387
```

Query:2502 ggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatggtcattgttggacaactttgaatggg 2561
Sbjct:388 ggtctggcgcaaatgtgaaaggattttttgcatggtcattgttggacaactttgaatggg 447

```
Query:2562 ctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactttgaatagat 2621
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:448   ctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactactttgaatagat 507
```

Query:2622 atcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatcaagagagtgccta 2681
|||||
Sbjct:508 atcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatcaagagagtgccta 567

Query:2682 aattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaa 2741
 |||
 Sbjct:568 aattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaa 627

```

Query:2742 agacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatcactagtgaatt 2801
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:628 agacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatcactagtgaatt 687

Query:2802 cgcggccgcctgcagtagcgtagaattcacgtggcccagccggcgtctcggatcggtacc 2861
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:688 cgcggccgcctgcagtagcgtagaattcacgtggcccagccggcgtctcggatcggtacc 747

Query:2862 tcgagccgcggcggccgcagcttttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa 2921
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:748 tcgagccgcggcggccgcagcttttctagaacaaaaactcatctcaaaagaggatctgaa 807

Query:2922 tagcgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagttttagcctt 2967
          |||||||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:808 tagcgccgtcgaacatcctcatcatcatcattgagttttagcctt 853

```

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของยีนดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคจีนในสกลายพันธุ์ H253F ใช้ไพรเมอร์ TRF1

CGAAATTTTTTGGGGAGCATCCTCCTCGTACCGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATANTCGGATAACTTC
ACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACC GCCTATAAGA
AGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAAC TTGGATGCTTATAGAATGCCATCTCCTGGCCTAGAATTCTCCAAC
GGGTAGGGTATGTGGAGGCATAAACCAAAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAAT
GGCATAACACCAATTTGTAAACATTTTTCTATGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAA
TCTATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAAGTATCGCGATCTTTGCTTCCAATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTTG
GATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACGCGGAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCT
CCATCGTACAATCCAAC TTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGTTTGCGCACAACCTGATCCTTT
CTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATTAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGT
TGTAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCAGATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTTCACAT
GGATGGTTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGATCCAGATAGCATGCAATCTAGTTGGAGTCGATTGGCTAA
GTTTACTACAGATCAAGCCCAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTTGGACTAAACTATTACACCCCTACTATG

Subjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคจีนเนสกลายพันธุ์ H253F

```

Query:1280  atttttgggacagcatcctcctcgtaccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtata 1339
            |||||
Sbjct:5     atttttggggagcatcctcctcgtacc-gtatgaaggtgagggcagagtaccaagtata 63

Query:1340  -tgggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgt 1398
            |
Sbjct:64    ntcggataacttcacccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgt 123

Query:1399  tgcagttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaactt 1458
            |||||
Sbjct:124   tgcagttgaccaatttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaactt 183

Query:1459  ggatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggttagtgg 1518
            |||||
Sbjct:184   ggatgcttatagaatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggttagtgg 243

```

Query:1519 aggcataaaccaaacaggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaa 1578
 ||
 Sbjct:244 aggcataaaccaaacaggagttgactactacaacaggctcatcaatgagtcactggccaa 303

Query:1579 tggcataaacaccattttgtaaccatttttcattgggatcttcacaagccttggaggatga 1638
 ||
 Sbjct:304 tggcataaacaccattttgtaaccatttttcattgggatcttcacaagccttggaggatga 363

Query:1639 gtacggtggcttcttaaatcatagcggtgtaaatgatttccaagactatgcggtatctttg 1698
 ||
 Sbjct:364 gtacggtggcttcttaaatcatagcggtgtaaatgatttccaagactatgcggtatctttg 423

Query:1699 cttccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatctt 1758
 ||
 Sbjct:424 cttccaattatttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatctt 483

Query:1759 caccgcgaatgggtatgcatacggtatgtttgcaccaggctcgatgttctccatcgtaaa 1818
 ||
 Sbjct:484 caccgcgaatgggtatgcatacggtatgtttgcaccaggctcgatgttctccatcgtaaa 543

Query:1819 tccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgat 1878
 ||
 Sbjct:544 tccaacttgcacaggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgat 603

Query:1879 cctttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaagg 1938
 ||
 Sbjct:604 cctttctcatgcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaagg 663

Query:1939 tacaataggcatttccttgtttgtagtttggttataaccgctttcaaatagcacatcaga 1998
 ||
 Sbjct:664 tacaataggcatttccttgtttgtagtttggttataaccgctttcaaatagcacatcaga 723

Query:1999 tcaaaatgctacccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggtttatggaccaccttac 2058
 ||
 Sbjct:724 tcaaaatgctacccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggtttatggaccaccttac 783

Query:2059 agcaggaaggatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttac 2118
 ||
 Sbjct:784 agcaggaaggatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttac 843

Query:2119 tacagatcaagccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacac 2178
 |||||||||||| ||
 Sbjct:844 tacagatcaagccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacac 903

Query:2179 cacta 2183
 | |||
 Sbjct:904 cccta 908

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัลโคจีนเนสกลายพันธุ์ H253F ใช้โปรแกรม TRFF2

NCCTCTTTTGAATGGGTAAGCATTGGATTACCTAAATGAGCCATCAATCTTCCCGGAATGGGTATGCATACGGT
 ATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATC
 TGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAA
 AGGTACAATAGGCATTTCTTGTGTTAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACC
 CAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAAT
 ATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAGTTAAGGGTTTATTGATTGTTTATTGG
 ACTAACTATTACACCACTAATATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCAGAT
 CCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTT
 ATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAA
 TGGTATAGATGAGAAGATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTAT
 TATCGTCAT

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็ของคัลโคจีนเนสกลายพันธุ์ H253F

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคจีนเนสกลายพันธุ์ H253F

Query:1724 aagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccggaatgggtatgcatacggg 1783
 |||
 Sbjct:19 aagcattggattac-ctaaatgagccatcaatcttc-ccggaatgggtatgcatacggg 76

Query:1784 atgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgacaggtggggatgca 1843
 |||
 Sbjct:77 atgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgacaggtggggatgca 136

Query:1844 ggaacagagacttatctggttgcgcaaacctgatcctttctcatgcagcaactgtccaa 1903
 |||
 Sbjct:137 ggaacagagacttatctggttgcgcaaacctgatcctttctcatgcagcaactgtccaa 196

Query:1904 gtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatttccttgtttgta 1963
 |||
 Sbjct:197 gtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcatttccttgtttgta 256

Query:1964 gtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctaccagcgatatctt 2023
 |||
 Sbjct:257 gtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctaccagcgatatctt 316

Query:2024 gacttcacatgtggatggtttatggaccacttacagcaggaagggtatccagatagcatg 2083
 |||
 Sbjct:317 gacttcacatgtggatggtttatggaccacttacagcaggaagggtatccagatagcatg 376

Query:2084 caatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagttaag 2143
 |||
 Sbjct:377 caatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagccaaattagttaag 436

Query:2144 gggtcatttgattttatttgactaaactattacaccactaactatgctaccaaatcagat 2203
 |||
 Sbjct:437 gggtcatttgattttatttgactaaactattacaccactaactatgctaccaaatcagat 496

Query:2204 gcgtcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagcaa 2263
 |||
 Sbjct:497 gcgtcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagcaa 556

Query:2264 cgcaatggggtctttatagggtcagtgactccctcaggatggatgtgcatttatccaaa 2323
 |||
 Sbjct:557 cgcaatggggtctttatagggtcagtgactccctcaggatggatgtgcatttatccaaa 616

Query:2324 ggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttgggtttacatc 2383
 |||
 Sbjct:617 ggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttgggtttacatc 676

Query:2384 actgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttgata 2443
 |||
 Sbjct:677 actgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttgata 736

Query:2444 gacacttatagaattgatagttattatcgatcat 2476
 |||
 Sbjct:737 gacacttatagaattgatagttattatcgatcat 769

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F ใช้ไพรเมอร์ TRFF3

GGGAGTATAGCCAATTAGTTAAGGGTTCATCTTGATTTTACTTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACC
 AAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCAGATCGTCAAGTCACTCTTACAGCAACGCAATG
 GGGTCTTTATAGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTA
 CTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTA
 TCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAA
 TTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGGCTGAGGGTTATAC
 ATCAGGATTTGGATTATATTTTGTGAACCTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAG
 TATTTTCTGGCAGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAATTTTAGCACCAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGA
 TGATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTC
 GCGGCCGCTGCAGTACGTAGAATTCACGTGGCCAGCCGCGCTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGCGCGCCG
 CCAGCTTTCTAGAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCTTT
 GATTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACCAGAAAGACCGGTCTTGCTAGATTCT
 AATCAAGAAGATGTCAAAATGCCATTTGCCTGAAAGAAGCCGGCTTC

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ H253F

Query:2551 ctttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactac 2610
 |||
 Sbjct:433 ctttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatattttgtgaactacactac 492

Query:2611 tttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatca 2670
 |||
 Sbjct:493 tttgaatagatatcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatca 552

Query:2671 agagagtgcataaattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgat 2730
 |||
 Sbjct:553 agagagtgcataaattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgat 612

Query:2731 caaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatc 2790
 |||
 Sbjct:613 caaggaagaaaagacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatc 672

Query:2791 actagtgaattcgcgccgcctgcagtagcagtagaattcacgtggccagccggcgtctc 2850
 |||
 Sbjct:673 actagtgaattcgcgccgcctgcagtagcagtagaattcacgtggccagccggcgtctc 732

Query:2851 ggatcggtacctcgagccgcccggccgagcttttctagaacaaaaactcatctcagaa 2910
 |||
 Sbjct:733 ggatcggtacctcgagccgcccggccgagcttttctagaacaaaaactcatctcagaa 792

Query:2911 gaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttaga 2970
 |||
 Sbjct:793 gaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttaga 852

Query:2971 catgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgag-aagaccggtcttgctagattct 3029
|||||
Sbjct:853 catgactgttcctcagttcaagttgggcacttaccagaaagaccggtcttgctagattct 912

Query:3030 aatcaagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagatgcaggcttc 3076
|||||
Sbjct:913 aatcaagaagatgtcaaaatgccatttgcctgaaagaagccggcttc 959

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q ใช้ไพรเมอร์ AOXF1

CCTTTTTCGACTTTTTACGACAACTCTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTC
AATTTTACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAACGG
CACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTC
CAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCT
CTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCATGCTGCAGTTCTCATTCAACCGAA
GCTGTTTTCTTCAGATTTCATTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGACCAAGT
ATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAAT
TTCACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCC
TAGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGCTCATCAATG
AGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGAGGATGAGTAC
GGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATA
GGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTACCAGCAATGGGTATGCATACGGTATGTTGCACA

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N323Q

Query:888 cgacttttaacgacaa-ct-tgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgag 945
||||| ||||| || |||||
Sbjct:8 cgactttttacgacaaactctgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgag 67

Query:946 atttccttcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagt 1005
|||||
Sbjct:68 atttccttcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagt 127

Query:1006 caacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactc 1065
|||||
Sbjct:128 caacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactc 187

Query:1066 agatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgg 1125
|||||
Sbjct:188 agatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgg 247

Query:1126 gttattgtttataaataactactatttgccagcatttgctgctaaagaagaaggggtatctct 1185
|||||
Sbjct:248 gttattgtttataaataactactatttgccagcatttgctgctaaagaagaaggggtatctct 307

Query:1186 cgagaaaagagaggctgaagctgcacatcacatcacatcacatgctgcagttcc 1245
|||||
Sbjct:308 cgagaaaagagaggctgaagctgcacatcacatcacatcacatgctgcagttcc 367

Query:1246 tccattcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgta 1305
|||||
Sbjct:368 tccattcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgta 427

Query:1306 ccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatcc 1365
|||||
Sbjct:428 ccagtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatatcc 487

Query:1366 agaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataa 1425
|||||
Sbjct:488 agaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataa 547

Query:1426 gaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctg 1485
|||||
Sbjct:548 gaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctg 607

Query:1486 gcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaaacaggagttgacta 1545
 |||
 Sbjct:608 gcctagaattctcccaacgggtagggtagtgaggcataaaccaaacaggagttgacta 667

Query:1546 ctacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataaacaccatttgaaccatttt 1605
 |||
 Sbjct:668 ctacaacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataaacaccatttgaaccatttt 727

Query:1606 tcattgggatcttccacaagccttggaggatgagtagcgtggcttcttaaatcatagcgt 1665
 |||
 Sbjct:728 tcattgggatcttccacaagccttggaggatgagtagcgtggcttcttaaatcatagcgt 787

Query:1666 tgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttggagatagggttaa 1725
 |||
 Sbjct:788 tgtaaatgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatttggagatagggttaa 847

Query:1726 gcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacggat 1785
 |||
 Sbjct:848 gcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacggat 907

Query:1786 gtttgcac 1793
 |||
 Sbjct:908 gtttgcac 915

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัดโคชินเนสกลายพันธุ์ N323Q ใช้ไพรเมอร์ TRF1

AGGAAATTTTGGGAGCATCCTCCTCGTACAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCAC
 CCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAG
 GATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTCTCCCAACGG
 GTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAATGG
 CATAACACCATTTGTAACCATTTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAAT
 CATAGCGTTGTAAATGATTTCAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGA
 TTACACTAAATGAGCCATCAATCTTACCAGCAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAAGGTCGATGTTCTCC
 ATCGTACAATCCAATTCACAGGTGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTTTCT
 CATGCAGCAACTGTCCAAGGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACG
 TAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGG
 ATGGTTTATGGACCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAG
 TTTACTACAGATCAAGCCCAATTAGTTAAGGGTTTCATTTGATTTTTATGGACTACAATATTACACCACTAACTATG
 CTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCCTAGTTACCTCCAGAATCCTCAGTC

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคัดโคชินเนสกลายพันธุ์ N323Q

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัดโคชินเนสกลายพันธุ์ N323Q

Query:1291 agcatcctcctcgtaccagtatgaaggtaggggcagagtaccaagtatatgggataactt 1350
 |||
 Sbjct:15 agcatcctcctcgtac-agtatgaaggtaggggcagagtaccaagtatatgggataactt 73

Query:1351 caccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgcagttgacca 1410
 |||
 Sbjct:74 caccaccaatatccagaaaagatagcggatagaagcaacggagatgttgcagttgacca 133

Query:1411 atttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatag 1470
 |||
 Sbjct:134 atttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatag 193

Query:1471 aatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggttagtggaggcataaacca 1530
 ||
 Sbjct:194 aatgtccatctcctggcctagaattctcccaacgggtagggttagtggaggcataaacca 253

Query:1531 aacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatggcataaacacc 1590
 ||
 Sbjct:254 aacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatggcataaacacc 313

Query:1591 atttgtaaccatttttcatgtggatcttccacaagccttggaggatgagtacgggtggctt 1650
 ||
 Sbjct:314 atttgtaaccatttttcatgtggatcttccacaagccttggaggatgagtacgggtggctt 373

Query:1651 cttaaatacatagcgttgtaaatagtttccaagactatgcggatctttgcttccaattatt 1710
 ||
 Sbjct:374 cttaaatacatagcgttgtaaatagtttccaagactatgcggatctttgcttccaattatt 433

Query:1711 tggagatagggtaaagcattggattactaaatgagccatcaatcttcaccgcaatgg 1770
 ||
 Sbjct:434 tggagatagggtaaagcattggattactaaatgagccatcaatcttcaccgcaatgg 493

Query:1771 gtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgcac 1830
 ||
 Sbjct:494 gtatgcatacgggtatgtttgcaccaggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgcac 553

Query:1831 aggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgc 1890
 ||
 Sbjct:554 aggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcatgc 613

Query:1891 agcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcat 1950
 ||
 Sbjct:614 agcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtacaataggcat 673

Query:1951 ttccttgcacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctac 2010
 ||
 Sbjct:674 ttccttgcacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgctac 733

Query:2011 ccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggta 2070
 ||
 Sbjct:734 ccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggta 793

Query:2071 tccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagc 2130
 ||
 Sbjct:794 tccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagc 853

Query:2131 caaattagttaagggttcatttgattttatggactacaataattacaccactaactatgc 2190
 | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
 Sbjct:854 ccaattagttaagggttcatttgattttatggactacaataattacaccactaactatgc 913

Query:2191 taccaaatcagatgctgcaacatgctgccca-cctagttacctc 2233
 |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
 Sbjct:914 taccaaatcagatgctgcaacatgctgcccacctagttacctc 957


```

Query:2310 gcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatc 2369
          |||
Sbjct:618 gcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatc 677

Query:2370 ctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttg 2429
          |||
Sbjct:678 ctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttg 737

Query:2430 aggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttc 2489
          |||
Sbjct:738 aggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttc 797

Query:2490 gatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggttgaca 2549
          |||
Sbjct:798 gatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggttgaca 857

Query:2550 actttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatatatttgtgaactacacta 2609
          |||
Sbjct:858 actttgaatgggctgagggttatacatcacgatttggattatatatttgtgaactacccta 917

Query:2610 cttt 2613
          |||
Sbjct:918 cttt 921

```

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัดโคจีนสกลายพันธุ์ N323Q ใช้ไพรเมอร์ TRF3

```

TGTTAGCAATAGTTAGGGTTCAATTTGATTTTATTGGACTACAATATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGAT
GCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTA
TAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGA
AAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAG
GAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTG
GCGCAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGGCTGAGGGTTATACATCACGATT
TGGATTATATTTGTGAACCTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAGTATTTTCTG
GCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATGATCAAGG
AAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC
TGCAGTACGTAGAATTCACGTGGCCAGCCGGCCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGCGGCCGCCAGCTTTC
TAGAACAAA

```

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคัดโคจีนสกลายพันธุ์ N323Q

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัดโคจีนสกลายพันธุ์ N323Q

```

Query:2142 agggttcatttgattttattggactacaattattacaccactaactatgctaccaaactcag 2201
          |||
Sbjct:15 agggttcatttgattttattggactacaattattacaccactaactatgctaccaaactcag 74

Query:2202 atgctcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagc 2261
          |||
Sbjct:75 atgctcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagc 134

Query:2262 aacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgcatattatccaa 2321
          |||
Sbjct:135 aacgcaatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgcatattatccaa 194

Query:2322 aaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttgggtttaca 2381
          |||
Sbjct:195 aaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttgggtttaca 254

```

Query:2382 tcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttga 2441
 ||
 Sbjct:255 tcactgaaaatggtatagatgagaagaatgatgcatcactatcacttgaggaatccttga 314

 Query:2442 tagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgatatgcaatta 2501
 ||
 Sbjct:315 tagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgatatgcaatta 374

 Query:2502 ggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcacggcattggtggacaactttgaatggg 2561
 ||
 Sbjct:375 ggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcacggcattggtggacaactttgaatggg 434

 Query:2562 ctgaggggtatacatcacgatttggattatatttctggaactacactactttgaatagat 2621
 ||
 Sbjct:435 ctgaggggtatacatcacgatttggattatatttctggaactacactactttgaatagat 494

 Query:2622 atcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatcaagagagtgcga 2681
 ||
 Sbjct:495 atcccaagctctctgcaacatggttcaagtattttctggcacgtgatcaagagagtgcga 554

 Query:2682 aattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaa 2741
 ||
 Sbjct:555 aattggaaatttttagcaccaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaa 614

 Query:2742 agacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaactactagtgaatt 2801
 ||
 Sbjct:615 agacaaaacccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaactactagtgaatt 674

 Query:2802 cgcgccgcctgcagtagatgtagaattcacgtggccagccggccgtctcggtacc 2861
 ||
 Sbjct:675 cgcgccgcctgcagtagatgtagaattcacgtggccagccggccgtctcggtacc 734

 Query:2862 tcgagccgcccggccgcccagcttttctagaacaaa 2896
 ||
 Sbjct:735 tcgagccgcccggccgcccagcttttctagaacaaa 769

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนคลอโคซินเนสกลายพันธุ์ K402Y

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ K402Y ใช้ไพรเมอร์ AOXF

```

CCCTTTTATACGACCTTTTAACGACANGNCTTGAGAAGATCAAAAAACAACCTAATTATTGAAACGATGAGATTT
CCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTGCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG
AAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCC
ATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGG
GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCATGCTGCAGTTCCTCCATTCA
ACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGT
ACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTT
GACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCT
CCTGGCCTAGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCT
CATCAATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTTCATTGGGATCTTCACAAGCCTTGGAG
GATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTAT
TTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTACCGCGAATGGGTATGCATACGGTAT
GTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCACTTGACAGTGGGGGAGCAGGAACAGAACTTA

```

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะจะเป็นของดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ K402Y

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ K402Y

```

Query:891  cttttaacgacaa--cttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatt 948
          |||
Sbjct:16   cttttaacgacangncttgagaagatcaaaaaacaactaattatttcgaaacgatgagatt 75

Query:949  tccttcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaa 1008
          |||
Sbjct:76   tccttcaatttttactgctgttttatttcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaa 135

Query:1009 cactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcaga 1068
          |||
Sbjct:136  cactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcaga 195

Query:1069 tttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggtt 1128
          |||
Sbjct:196  tttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggtt 255

Query:1129 attgtttataaataactactatttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcga 1188
          |||
Sbjct:256  attgtttataaataactactatttgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcga 315

Query:1189 gaaaagagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctcc 1248
          |||
Sbjct:316  gaaaagagaggctgaagctgcacatcaccatcaccatcatcaccatgctgcagttcctcc 375

Query:1249 attcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtagca 1308
          |||
Sbjct:376  attcaaccgaagctgttttccttcagatttcatttttgggacagcatcctcctcgtagca 435

Query:1309 gtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatattccaga 1368
          |||
Sbjct:436  gtatgaaggtgagggcagagtaccaagtatatgggataacttcacccaccaatattccaga 495

Query:1369 aaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaa 1428
          |||
Sbjct:496  aaagatagcggatagaagcaacggagatgttgagttgaccaatttcaccgctataagaa 555

Query:1429 ggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctggcc 1488
          |||
Sbjct:556  ggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatagaatgtccatctcctggcc 615

```

Query:1489 tagaattctcccaacgggtagggtagtgagggcataaaccaaacaggagttgactacta 1548
 |||
 Sbjct:616 tagaattctcccaacgggtagggtagtgagggcataaaccaaacaggagttgactacta 675

Query:1549 caacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaaccatttttca 1608
 |||
 Sbjct:676 caacaggctcatcaatgagtcactggccaatggcataacaccatttgaaccatttttca 735

Query:1609 ttgggatcttcacaagccttggaggatgagtacgggtggcttcttaaatcatagcggtgt 1668
 |||
 Sbjct:736 ttgggatcttcacaagccttggaggatgagtacgggtggcttcttaaatcatagcggtgt 795

Query:1669 aaatgatttccaagactatgcggtatcttgccttccaattatttggagatagggtaaagca 1728
 |||
 Sbjct:796 aaatgatttccaagactatgcggtatcttgccttccaattatttggagatagggtaaagca 855

Query:1729 ttggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacgggatgtt 1788
 |||
 Sbjct:856 ttggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaatgggtatgcatacgggatgtt 915

Query:1789 tgcaccaggctcgatgttctccatcgtacaatccaacttgcacagggtggggatgcaggaac 1848
 |||
 Sbjct:916 tgcaccaggctcgatgttctccatcgtacaatcc-acttgaca-gtgggggagcaggaac 973

Query:1849 aga 1851
 |||
 Sbjct:974 aga 976

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัลโคซินสกลายพันธุ์ K402Y ใช้ไพรเมอร์ TRF1

GGAAATTTTGGGAGCATCCTCCTCGTACCGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACC
 CACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAGG
 ATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCCTAGAATTTCTCCCAACGGG
 TAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAATGGC
 ATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATC
 ATAGCGTTGTAAATGATTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGAT
 TACATAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAAGGTCGATGTTCTCCA
 TCGTACAATCCAACCTTGACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGTTGCGCACAACTGATCCTTTCTC
 ATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACGCT
 AGTTTGGGTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGA
 TGGTTTATGGACCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGT
 TTACTACAGATCAAGCCAAATTAGTTAAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGC
 TACCAAATCAGATGCGTCAACATG

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของดัลโคซินสกลายพันธุ์ K402Y

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของดัลโคซินสกลายพันธุ์ K402Y

Query:1291 agcatcctcctcgatcaccagatgaaggtaggggagagtagccaagtatatgggataactt 1350
 |||
 Sbjct:14 agcatcctcctcgatcacc-gtatgaaggtaggggagagtagccaagtatatgggataactt 72

Query:1351 caccaccaatattccagaaaagatagcgatagaagcaacggagatgttgagttgacca 1410
 |||
 Sbjct:73 caccaccaatattccagaaaagatagcgatagaagcaacggagatgttgagttgacca 132

Query:1411 atttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatag 1470
 ||
 Sbjct:133 atttcaccgctataagaaggatattgcaatcatgaaggatatgaacttggatgcttatag 192

Query:1471 aatgtccatctcctggcctagaatttctccaacgggtagggtagtgaggcataaacca 1530
 ||
 Sbjct:193 aatgtccatctcctggcctagaatttctccaacgggtagggtagtgaggcataaacca 252

Query:1531 aacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatggcataacacc 1590
 ||
 Sbjct:253 aacaggagttgactactacaacagggtcatcaatgagtcactggccaatggcataacacc 312

Query:1591 atttgtaaccatttttcatctgggatcttccacaagccttggaggatgagtacgggtggctt 1650
 ||
 Sbjct:313 atttgtaaccatttttcatctgggatcttccacaagccttggaggatgagtacgggtggctt 372

Query:1651 cttaaatcatagcgttgtaaattgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatt 1710
 ||
 Sbjct:373 cttaaatcatagcgttgtaaattgatttccaagactatgcggatctttgcttccaattatt 432

Query:1711 tggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccggaatgg 1770
 ||
 Sbjct:433 tggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccggaatgg 492

Query:1771 gtatgcatacgggatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgac 1830
 ||
 Sbjct:493 gtatgcatacgggatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgatcaatccaacttgac 552

Query:1831 aggtggggatgcaggaacagagacttatctgggttgcgcacaacctgatcctttctcatgc 1890
 ||
 Sbjct:553 aggtggggatgcaggaacagagacttatctgggttgcgcacaacctgatcctttctcatgc 612

Query:1891 agcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaagggtacaataggcat 1950
 ||
 Sbjct:613 agcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaagggtacaataggcat 672

Query:1951 ttccttgcacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaatgctac 2010
 ||
 Sbjct:673 ttccttgcacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaatgctac 732

Query:2011 ccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggta 2070
 ||
 Sbjct:733 ccagcgatatcttgacttcacatgtggatgggttatggaccacttacagcaggaaggta 792

Query:2071 tccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagc 2130
 ||
 Sbjct:793 tccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagtttactacagatcaagc 852

Query:2131 caaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgc 2190
 ||
 Sbjct:853 caaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgc 912

Query:2191 taccaaatcagatgcgtcaacatg 2214
 ||||||||||||||||||||
 Sbjct:913 taccaaatcagatgcgtcaacatg 936

Query:1709	tttggagatagggtaaagcattggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaat	1768
Sbjct:11	tttggaga-agggtaaagc-ttggattacactaaatgagccatcaatcttcaccgcgaat	68
Query:1769	gggatatgcatacgggatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgtaaatccaacttgc	1828
Sbjct:69	gggatatgcatacgggatgtttgcaccagggtcgatgttctccatcgtaaatccaacttgc	128
Query:1829	acagggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcat	1888
Sbjct:129	acagggtggggatgcaggaacagagacttatctggttgcgcacaacctgatcctttctcat	188
Query:1889	gcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtaaataggc	1948
Sbjct:189	gcagcaactgtccaagtgtacaaaaggaagtatcaggaacatcagaaaggtaaataggc	248
Query:1949	atttccttgcacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgct	2008
Sbjct:249	atttccttgcacgtagtttgggttataaccgctttcaaatagcacatcagatcaaaatgct	308
Query:2009	accagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccacttacagcaggaagg	2068
Sbjct:309	accagcgatatcttgacttcacatgtggatggtttatggaccacttacagcaggaagg	368
Query:2069	tatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagttactacagatcaa	2128
Sbjct:369	tatccagatagcatgcaatatctagttggagatcgattgcctaagttactacagatcaa	428
Query:2129	gccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactat	2188
Sbjct:429	gccaaattagttaagggttcatttgattttattggactaaactattacaccactaactat	488
Query:2189	gtaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtc	2248
Sbjct:489	gtaccaaatacagatgcgtaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtc	548
Query:2249	actctcttacagcaacgcaatggggtctttatagggtccagtgactccctcaggatggatg	2308
Sbjct:549	actctcttacagcaacgcaatggggtctttatagggtccagtgactccctcaggatggatg	608

```

Query:2309 tgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaat 2368
          |||
Sbjct:609 tgcatttatccaaaaggacttcgagatttggtgctttacttcaaggaaaagtataacaat 668

Query:2369 cctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagtaaatgatgcatcactatcactt 2428
          |||
Sbjct:669 cctttggtttacatcactgaaaatggtatagatgagtaaatgatgcatcactatcactt 728

Query:2429 gaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatggt 2488
          |||
Sbjct:729 gaggaatccttgatagacacttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatggt 788

Query:2489 cgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggtggac 2548
          |||
Sbjct:789 cgatatgcaattaggtctggcgcaaatgtgaaaggatttttgcattggtcattggtggac 848

Query:2549 aactttgaatgggctgagggttatacatcacga-tttggattatattttgtgaactacac 2607
          |||
Sbjct:849 aactttgaatgggctgagggttatacatcacgattttggattatattttgtgaactacac 908

Query:2608 tactttgaatagatatccc 2626
          |||
Sbjct:909 tactttgaatagatatccc 927

```

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y ใช้ไพรเมอร์ TRF3

```

NCCGTTACAATAGTTAGGGTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGAT
GCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTA
TAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGA
AAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTATAGATGAGTACAATGATGCATCACTATCACTTGAG
GAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTTTCGATATGCAATTAGGTCTG
GCGCAAATGTGAAAGGATTTTTGTCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAATGGGCTGAGGGTTATACATCACGATT
TGGATTATATTTTGTGAACCTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATGGTTCAAGTATTTTCTG
GCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAATTTTAGCACCAAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATGATCAAGG
AAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC
TGCAGTAGCTAGAATTCAGTGGCCAGCCGGCCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGGCCGCCAGCTTTC
TAGAACAAAACTCATCTC

```

Query: ลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็นของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y

Sbjct: ผลการหาลำดับเบสของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ K402Y

```

Query:2147 tcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacagatgcg 2206
          |||
Sbjct:20 tcatttgattttattggactaaactattacaccactaactatgctaccaaatacagatgcg 79

Query:2207 tcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagcaacgc 2266
          |||
Sbjct:80 tcaacatgctgcccacctagttacctcacagatcctcaagtcactctcttacagcaacgc 139

Query:2267 aatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgcatttatccaaaagga 2326
          |||
Sbjct:140 aatggggtctttataggtccagtgactccctcaggatggatgtgcatttatccaaaagga 199

Query:2327 cttcgagatttggttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggtttacatcact 2386
          |||
Sbjct:200 cttcgagatttggttgctttacttcaaggaaaagtataacaatcctttggtttacatcact 259

```

Query:2387 gaaaatggtatagatgag^{tac}aatgatgcatcactatcacttgaggaatccttgatagac 2446
 ||
 Sbjct:260 gaaaatggtatagatgag^{tac}aatgatgcatcactatcacttgaggaatccttgatagac 319

 Query:2447 acttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgatatgcaattaggtct 2506
 ||
 Sbjct:320 acttatagaattgatagttattatcgatcatctcttttatgttcgatatgcaattaggtct 379

 Query:2507 ggcgcaaatgtgaaaggatTTTTTgcatgggtcattgttggacaactttgaatgggctgag 2566
 ||
 Sbjct:380 ggcgcaaatgtgaaaggatTTTTTgcatgggtcattgttggacaactttgaatgggctgag 439

 Query:2567 ggttatacatcacgatttggattatatttTgtgaactacactactttgaatagatatccc 2626
 ||
 Sbjct:440 ggttatacatcacgatttggattatatttTgtgaactacactactttgaatagatatccc 499

 Query:2627 aagctctctgcaacatggttcaagtatttctggcacgtgatcaagagagtgctaaattg 2686
 ||
 Sbjct:500 aagctctctgcaacatggttcaagtatttctggcacgtgatcaagagagtgctaaattg 559

 Query:2687 gaaatTTtagcacaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaaagaca 2746
 ||
 Sbjct:560 gaaatTTtagcacaaaggcaagatggagcttatcaacgatgatcaaggaagaaaagaca 619

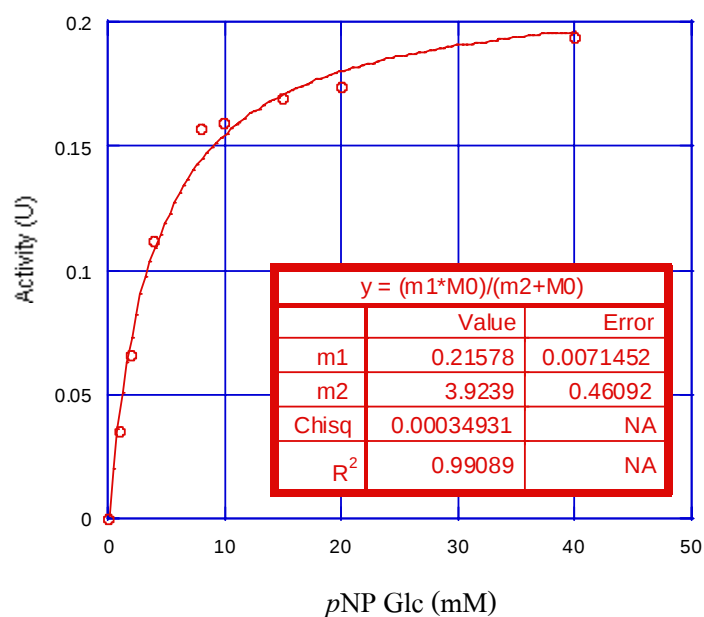
 Query:2747 aaaccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatcactagtgaattcgcg 2806
 ||
 Sbjct:620 aaaccaagtggggcattgaaggcttttgatctagatcttaatcactagtgaattcgcg 679

 Query:2807 ccgcctgcagtacgtagaattcacgtggcccagccggccgtctcggatcggtacctcgag 2866
 ||
 Sbjct:680 ccgcctgcagtacgtagaattcacgtggcccagccggccgtctcggatcggtacctcgag 739

 Query:2867 ccgcggcgccgccagctttctagaacaaaaactcatctc 2906
 ||
 Sbjct:740 ccgcggcgccgccagctttctagaacaaaaactcatctc 779

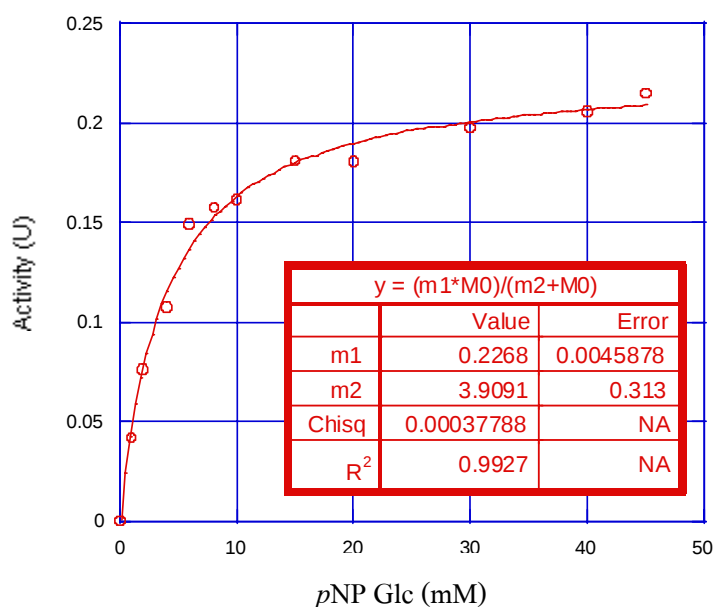
ภาคผนวก จ
กราฟ Michaelis-Menten

1. กราฟ Michaelis-Menten ของดีลโคซิเนสธรรมชาติต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



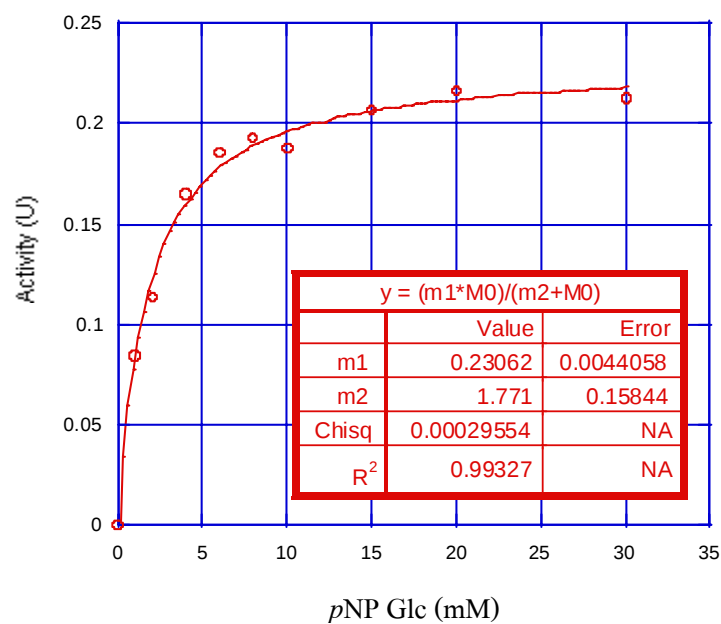
ภาพผนวกที่ ๑1 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของดีลโคซิเนสธรรมชาติต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

2. กราฟ Michaelis-Menten ของรีคอมบิแนนท์ดีลโคซิเนสต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



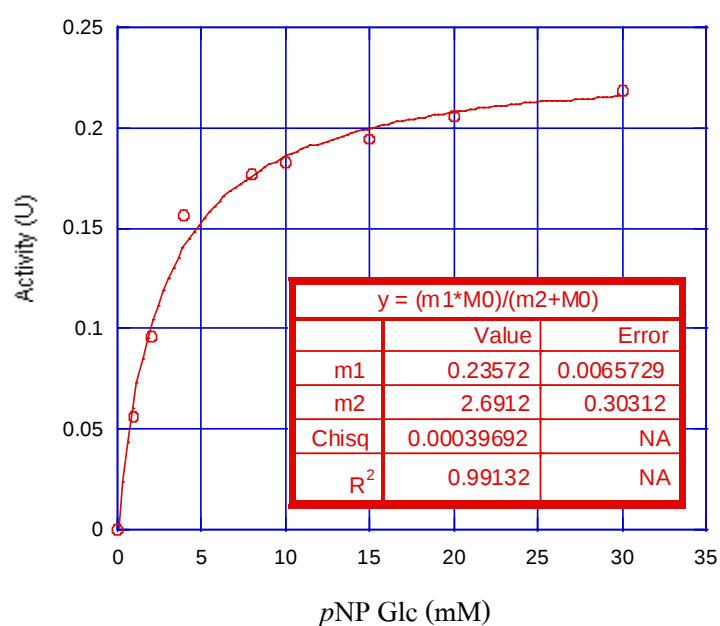
ภาพผนวกที่ ๑2 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของรีคอมบิแนนท์ดีลโคซิเนสต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

3. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



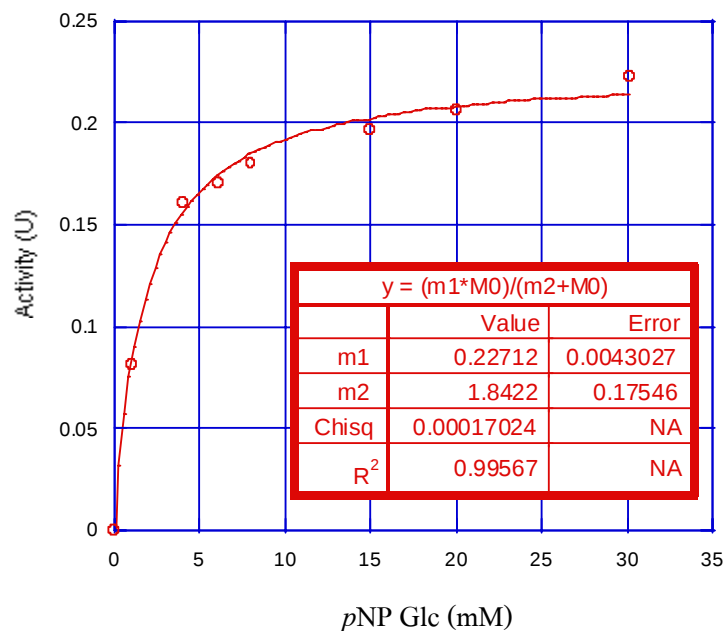
ภาพผนวกที่ ๓3 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

4. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



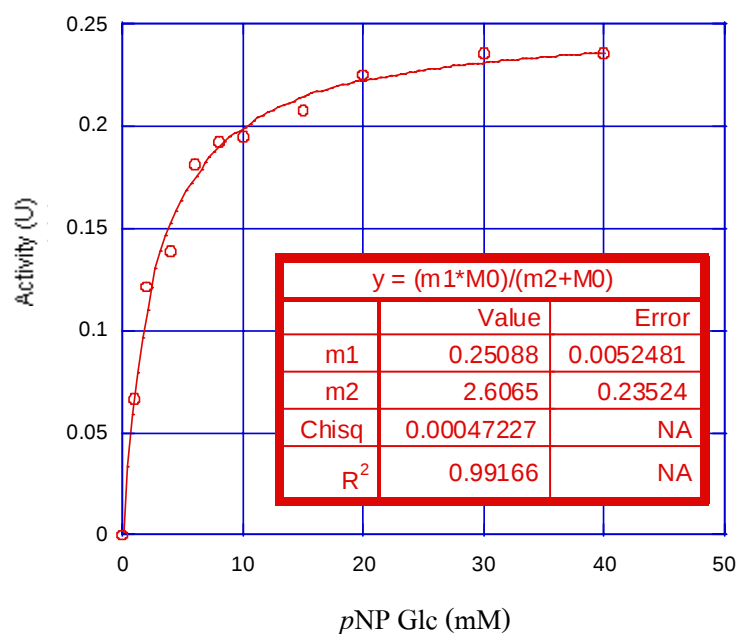
ภาพผนวกที่ ๓4 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

5. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรท pNP-Glc



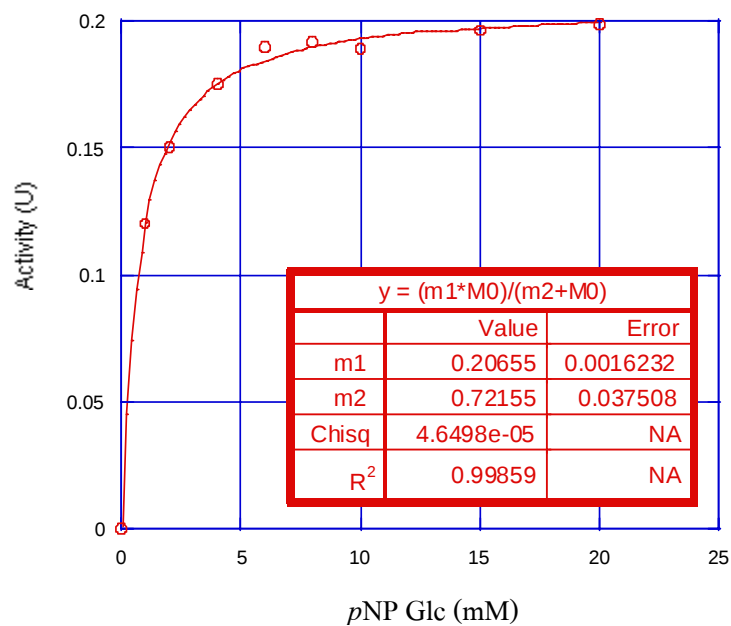
ภาพผนวกที่ ๑5 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรท pNP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

6. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรท pNP-Glc



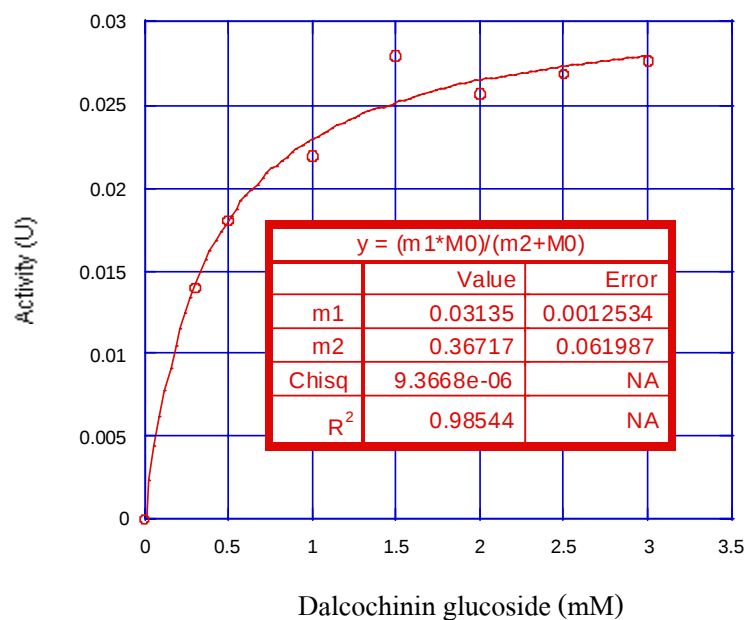
ภาพผนวกที่ ๑6 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรท pNP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

7. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ลินามารินต่อสับสเตรท *p*NP-Glc



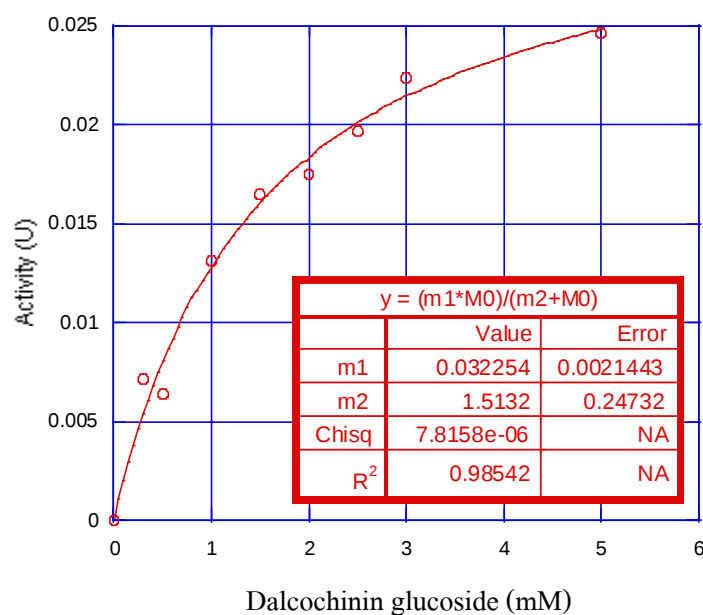
ภาพผนวกที่ ๗7 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามารินต่อสับสเตรท *p*NP-Glc ตามสมการของ Michaelis-Menten

8. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรทดัลโคชินินกลูโคไซด์



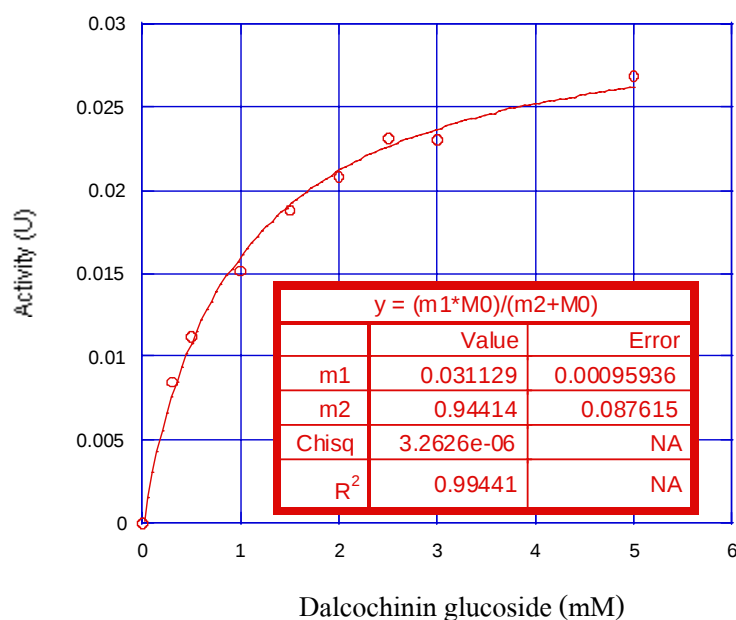
ภาพผนวกที่ ๗8 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรทดัลโคชินินกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten

9. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรทคัลโคชินินกลูโคไซด์



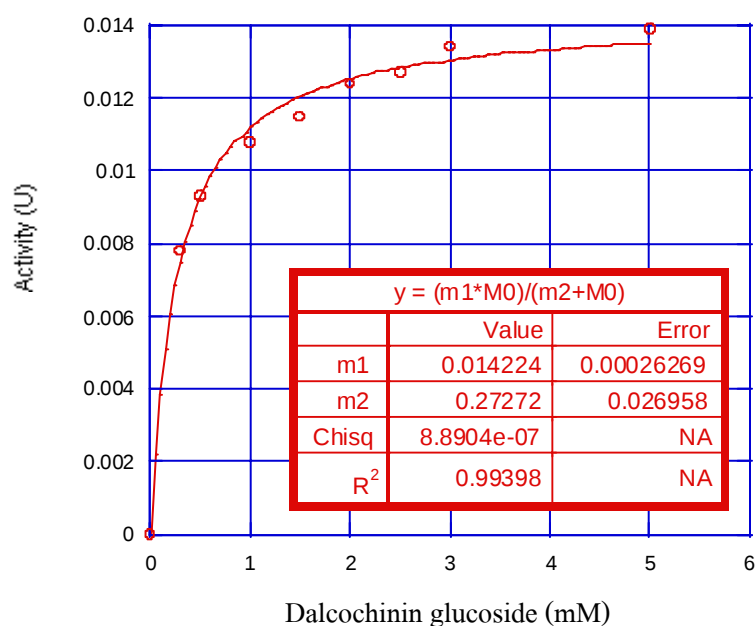
ภาพผนวกที่ ๙ กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรทคัลโคชินินกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten

10. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรทคัลโคชินินกลูโคไซด์



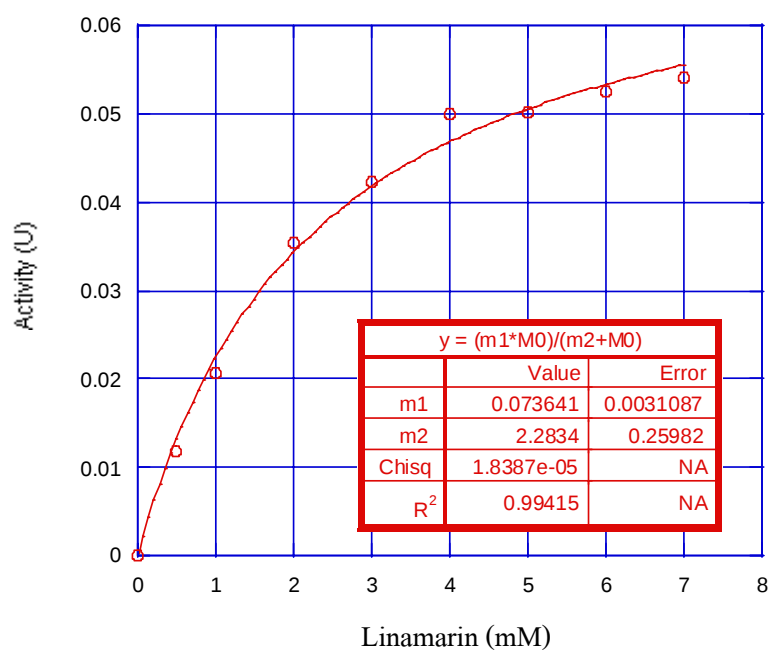
ภาพผนวกที่ ๑๐ กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรทคัลโคชินินกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten

11. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรตคัลโคชินินกลูโคไซด์



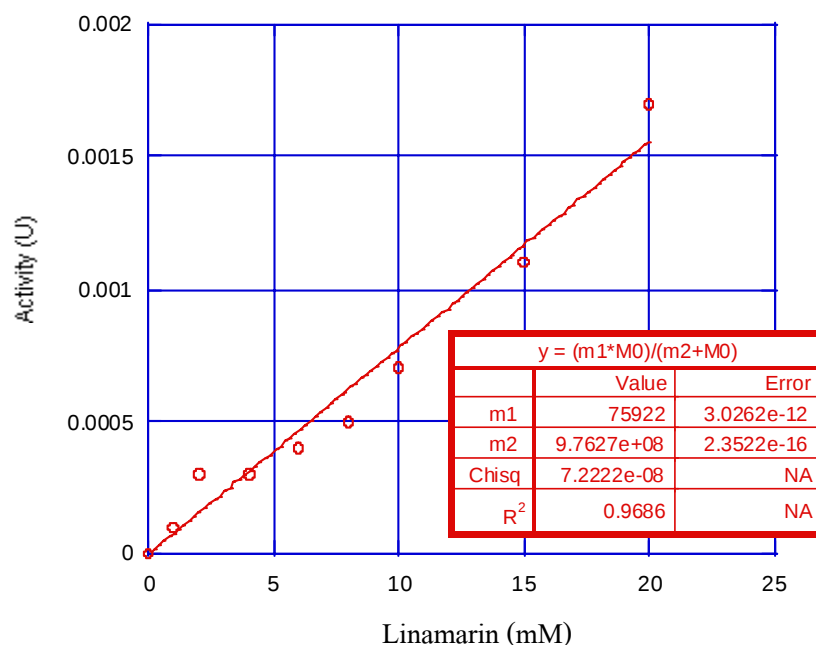
ภาพผนวกที่ 11 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรตคัลโคชินินกลูโคไซด์ตามสมการของ Michaelis-Menten

12. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ลินามารสต่อสับสเตรตลินามาริน



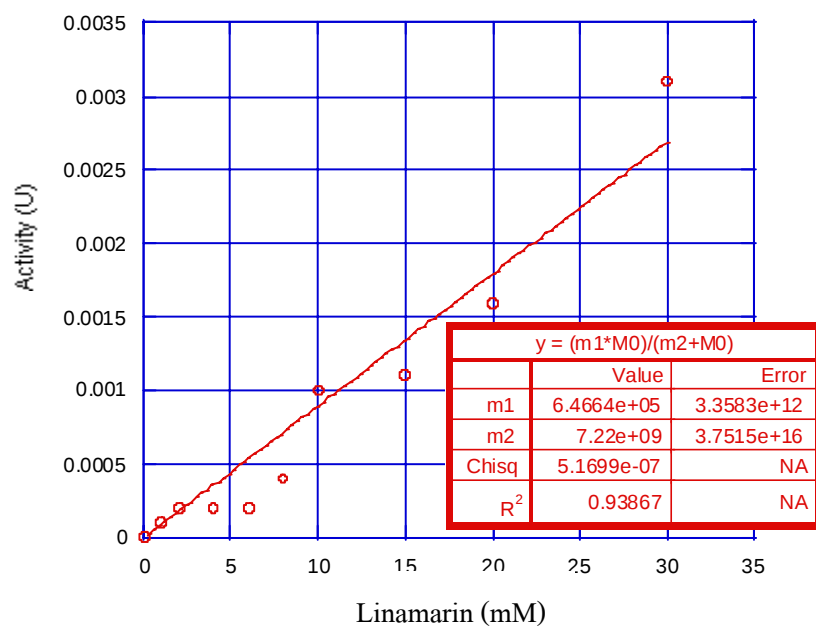
ภาพผนวกที่ 12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ลินามารสต่อสับสเตรตลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten

13. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรทลินามาริน



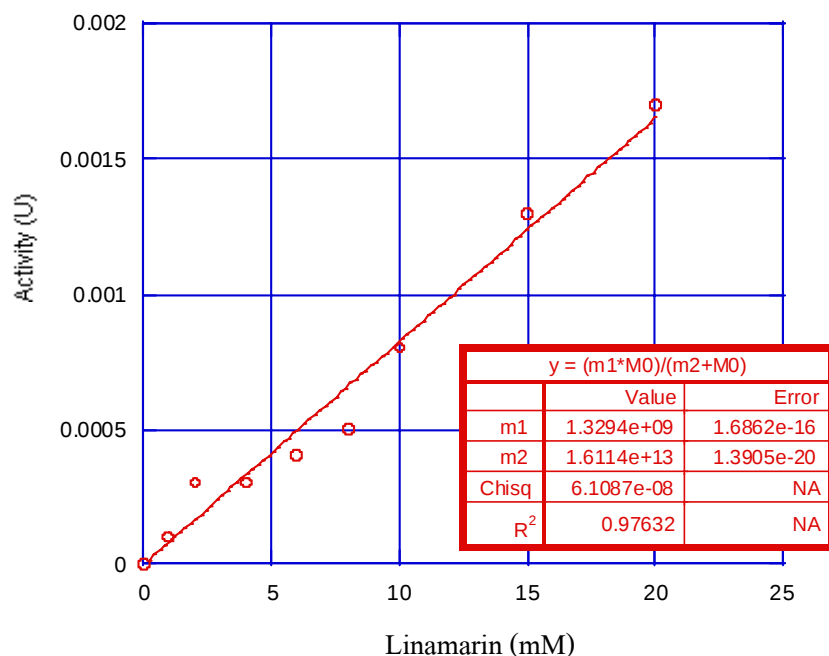
ภาพผนวกที่ 13 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ M195V ต่อสับสเตรท
ลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten

14. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรทลินามาริน



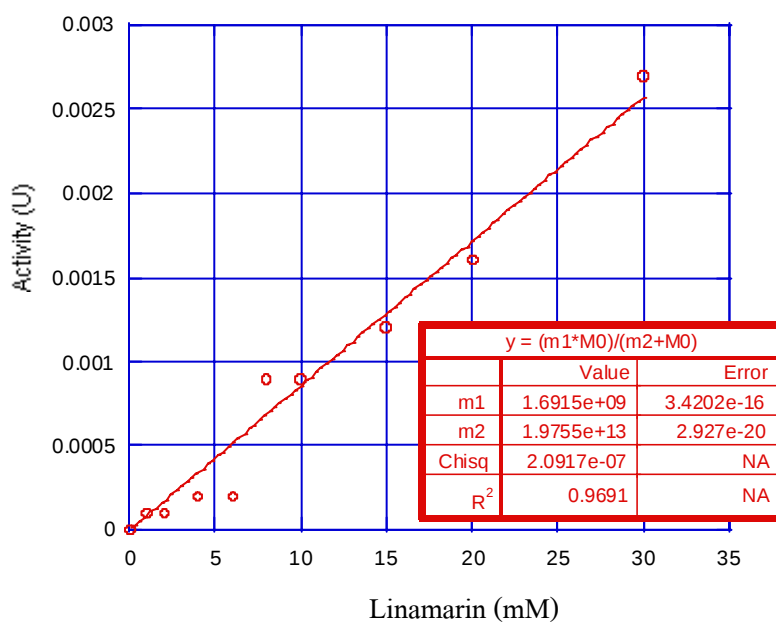
ภาพผนวกที่ 14 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ H253F ต่อสับสเตรท
ลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten

15. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรทลินามาริน



ภาพผนวกที่ 15 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q ต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten

16. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรทลินามาริน

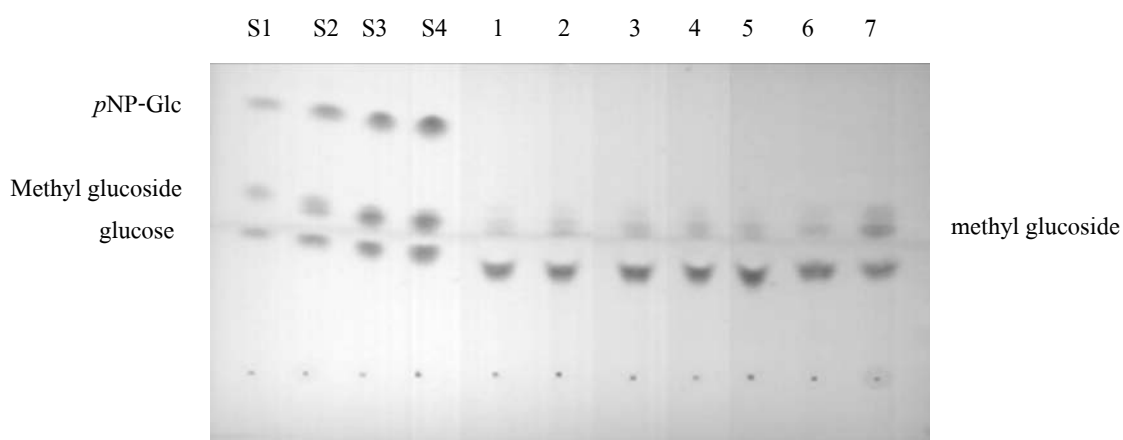


ภาพผนวกที่ 16 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y ต่อสับสเตรทลินามารินตามสมการของ Michaelis-Menten

ภาคผนวก ข

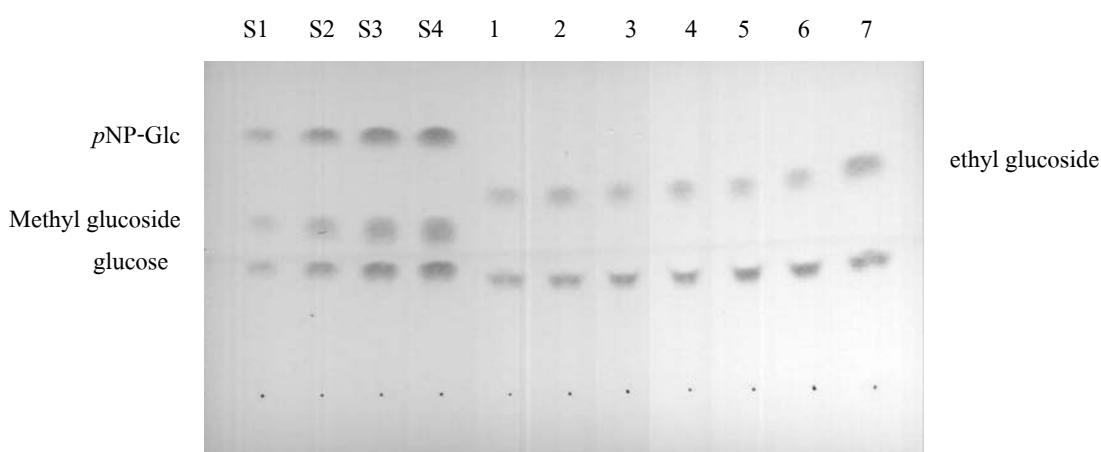
ภาพ TLC

1. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M methanol เป็นตัวรับน้ำตาล



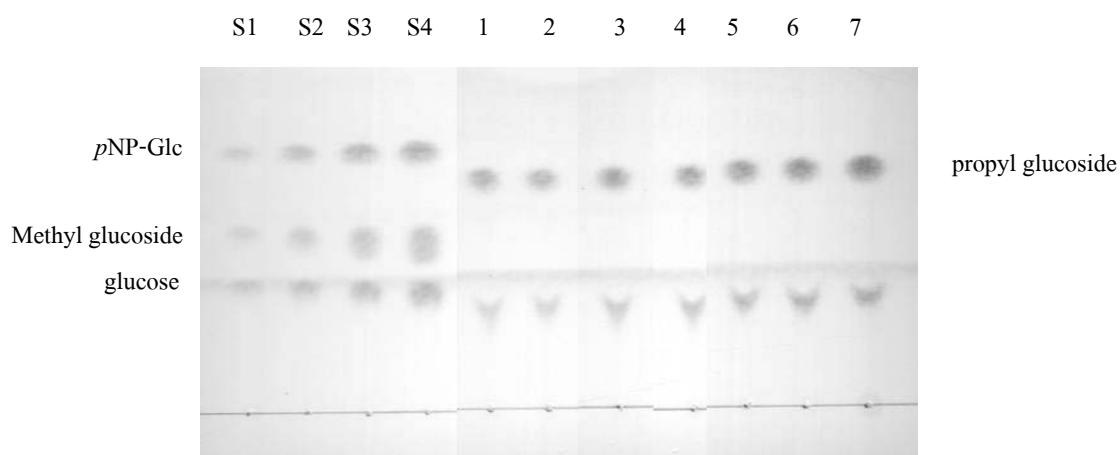
ภาพผนวกที่ ข1 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M methanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

2. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M ethanol เป็นตัวรับน้ำตาล



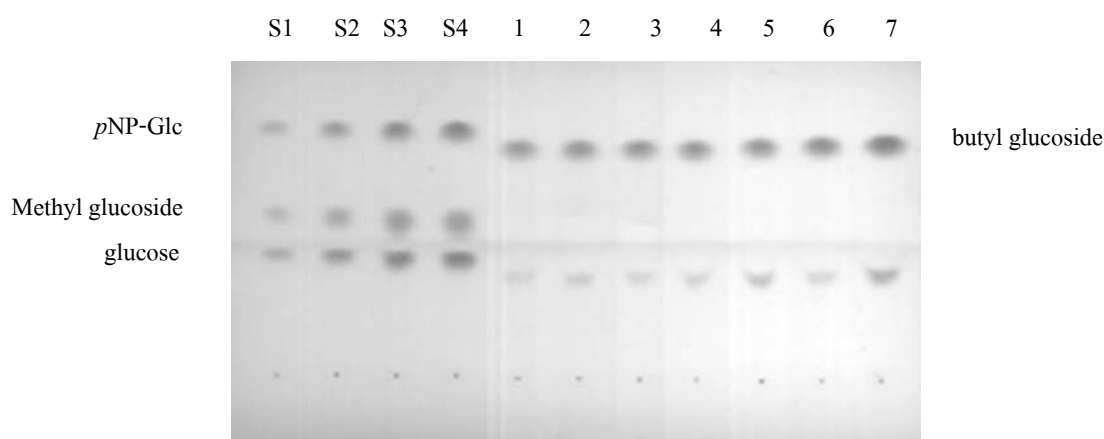
ภาพผนวกที่ ข2 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M ethanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

3. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *n*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาล



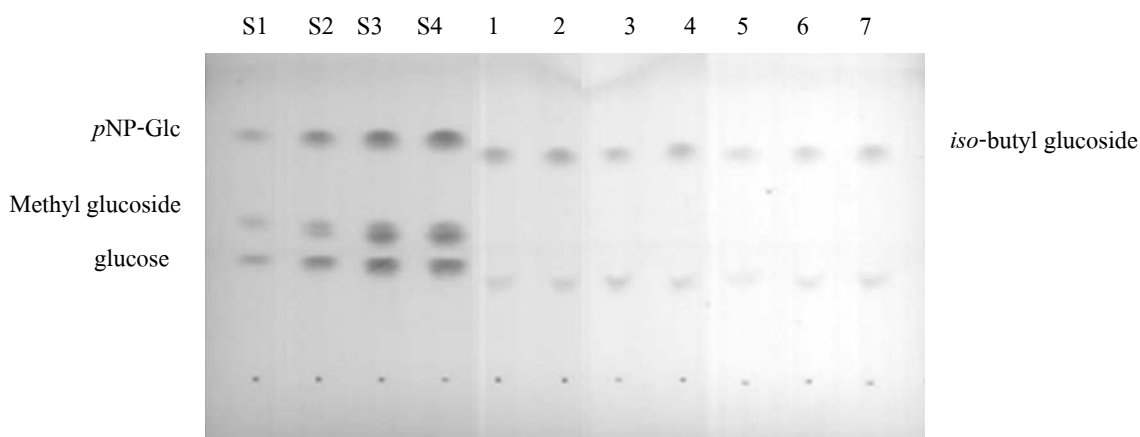
ภาพผนวกที่ ข3 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *n*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

4. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *n*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล



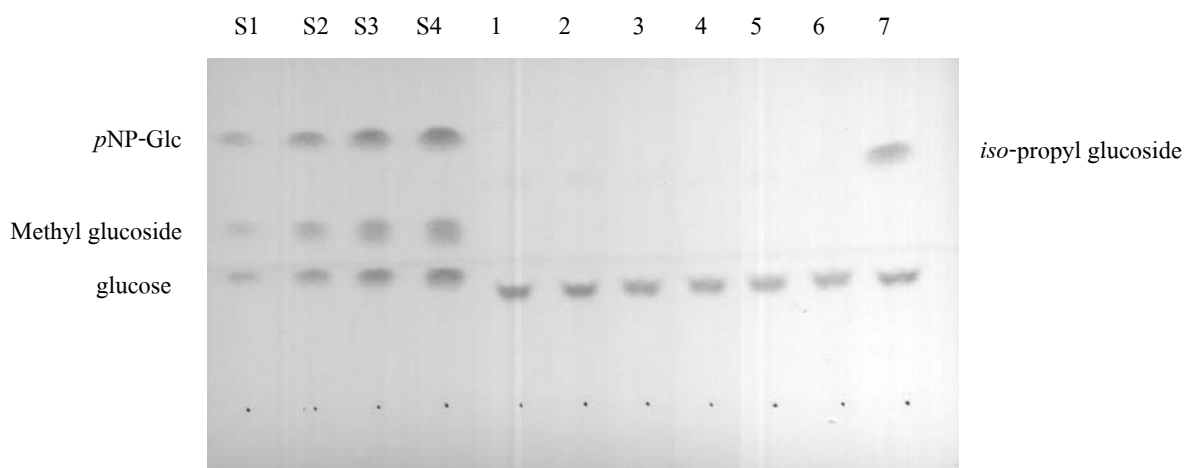
ภาพผนวกที่ ข4 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *n*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

5. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *iso*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล



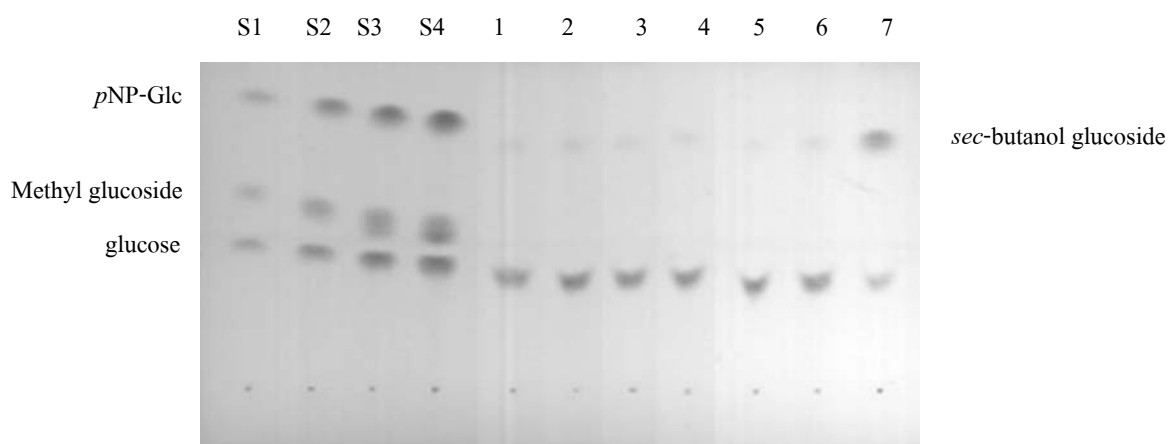
ภาพผนวกที่ ข5 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *iso*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

6. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาล



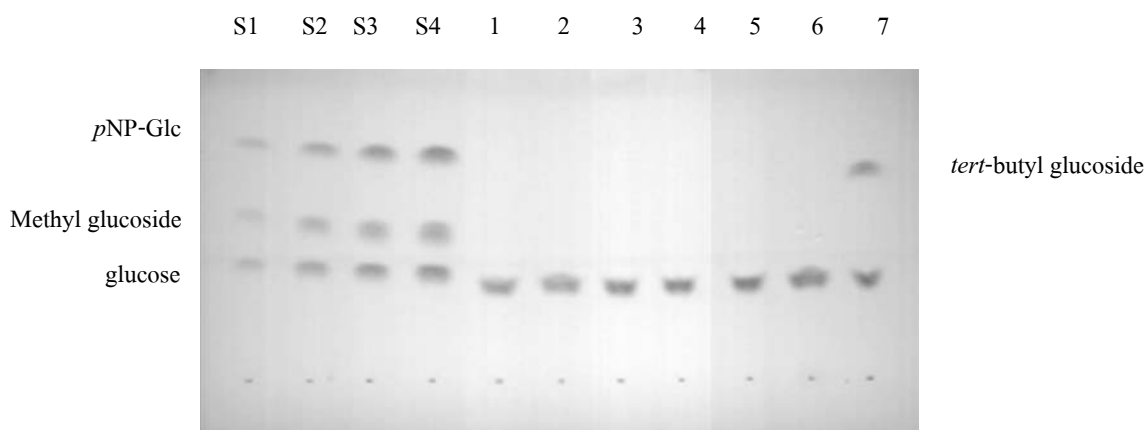
ภาพผนวกที่ ข6 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

7. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *sec*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล



ภาพผนวกที่ ข7 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *sec*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

8. ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *tert*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล



ภาพผนวกที่ ข8 ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M *tert*-butanol เป็นตัวรับน้ำตาล โดย S1-S4 เป็นสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 20 nmol, 40 nmol, 60 nmol และ 80 nmol ตามลำดับ 1-7 เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์กลายพันธุ์ M195V เอนไซม์กลายพันธุ์ H253F เอนไซม์กลายพันธุ์ N323Q เอนไซม์กลายพันธุ์ K402Y รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนส คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์ลินามาเรส ตามลำดับ

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวอมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 เมษายน 2525
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สาขาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	